

TRAITE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 24 mai 2000 (24.05.00)	
Demande internationale no PCT/FR99/02691	Référence du dossier du déposant ou du mandataire B0018WO
Date du dépôt international (jour/mois/année) 04 novembre 1999 (04.11.99)	Date de priorité (jour/mois/année) 05 novembre 1998 (05.11.98)
Déposant BENAROCH, Philippe etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

22 avril 2000 (22.04.00)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé Diana Nissen
no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	no de téléphone: (41-22) 338.83.38

...is Page Blank (uspto)



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : C12N 5/10, A61K 39/385, C07K 16/00, C12N 15/12, G01N 33/50, A61K 39/395	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/28001 (43) Date de publication internationale: 18 mai 2000 (18.05.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02691 (22) Date de dépôt international: 4 novembre 1999 (04.11.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/13946 5 novembre 1998 (05.11.98) FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR). INSTITUT CURIE [FR/FR]; 26, rue d'Ulm, F-75248 Paris Cedex 05 (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BENAROCH, Philippe [FR/FR]; 32bis, avenue René Coty, F-75014 Paris (FR). VINCENT-SCHNEIDER, Hélène [FR/FR]; 13, allée Berlioz, F-94800 Villejuif (FR). STUMPTNER, Pamela [DE/FR]; 22, rue Pasteur, F-92160 Antony (FR). AMIGORENA, Sebastian [FR/FR]; 124, boulevard A. Blanqui, F-75013 Paris (FR). BONNEROT, Christian [FR/FR]; 6, impasse Marchand, F-94130 Nogent sur Marne (FR). RAPOSO, Graça [FR/FR]; 8, rue Saint-Martin, F-75004 Paris (FR).	(74) Mandataire: CABINET BECKER ET ASSOCIES; 10, rue de Milan, F-75009 Paris (FR). (81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>	
(54) Title: MODIFIED EXOSOMES AND USES (54) Titre: EXOSOMES MODIFIES ET UTILISATIONS (57) Abstract <p>The invention concerns the fields of biology and immunology. It concerns membrane vesicles comprising molecules, in particular antigenic molecules, with predetermined structure, and their uses. More particularly, it concerns vesicles (exosomes) comprising recombinant molecules of the major histocompatibility complex, and their use as immunogen or for diagnostic and therapeutic purposes. The invention also concerns methods for producing said vesicles, genetic constructs, cells and compositions, useful for implementing said methods.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention concerne les domaines de la biologie et de l'immunologie. Elle est relative à des vésicules membranaires comportant des molécules, notamment antigéniques, de structure prédéterminée, et à leurs utilisations. Elle concerne plus particulièrement des vésicules (exosomes) comportant des molécules recombinantes du complexe majeur d'histocompatibilité, et leur utilisation comme immunogène ou comme outil diagnostique ou thérapeutique. L'invention est également relative à des méthodes de production de ces vésicules, des constructions génétiques, cellules et compositions, utilisables pour la mise en oeuvre des méthodes de l'invention.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

EXOSOMES MODIFIES ET UTILISATIONS

La présente invention concerne les domaines de la biologie et de l'immunologie. Elle est relative à des vésicules membranaires comportant des molécules, notamment antigéniques, de structure prédéterminée, et à leurs utilisations. Elle concerne plus particulièrement des vésicules comportant des molécules recombinantes du complexe majeur d'histocompatibilité, et leur utilisation comme immunogène ou comme outil diagnostique ou thérapeutique. L'invention est également relative à des méthodes de production de ces vésicules, des constructions génétiques, cellules et compositions, utilisables pour la mise en oeuvre des méthodes de l'invention.

La spécificité de la reconnaissance antigénique est une caractéristique majeure des cellules du système immunitaire. Les lymphocytes B reconnaissent les antigènes sous forme native. Les lymphocytes T reconnaissent les complexes formés par l'association de peptides provenant de la dégradation d'antigènes avec des molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Les peptides, dérivés des antigènes synthétisés par les cellules de l'organisme (antigènes tumoraux ou viraux), s'associent aux molécules de classe I du CMH qui sont reconnues par les lymphocytes T cytotoxiques. Les peptides dérivés d'antigènes exogènes s'associent aux molécules de classe II du CMH qui sont reconnues par les lymphocytes T auxiliaires. L'identification des peptides présentés par les molécules du CMH et reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques (CD8) ou auxiliaires (CD4) a été à l'origine de nouvelles stratégies thérapeutiques et vaccinales. Cette évolution des immunothérapies nécessite le développement de techniques d'évaluation de la réponse immunitaire spécifique d'antigènes.

Les peptides antigéniques s'associent avec les molécules du CMH dans des compartiments intracellulaires. Pour les molécules de classe II, ceux-ci sont composés de vésicules, contenues dans un granule plus large appartenant à la voie endocytyque (Peters et al., Nature 349 (1991) 669). Leur fusion avec la membrane plasmique aboutit, d'une part, à l'expression de complexes peptide-CMH à la surface cellulaire et d'autre part, à la sécrétion de ces vésicules appelées exosomes.

Les travaux de Raposo et al. (J. Exp. Med. 183 (1996) 1161) ont montré que les lymphocytes B sont capables de sécréter des vésicules exosomes, portant des molécules de classe II du CMH. En outre, Zitvogel et al. (Nature Medicine 4 (1998) 594) ont mis en évidence la production de vésicules membranaires particulières par les cellules dendritiques (désignées dexosomes), ayant des propriétés avantageuses. Ainsi, ces vésicules expriment des molécules des classes I et II du CMH, et sont capables, après

sensibilisation aux antigènes correspondants, de stimuler in vivo la production de lymphocytes T cytotoxiques et de provoquer la régression totale ou partielle de tumeurs.

La présente invention concerne de nouvelles méthodes et compositions utilisables dans les domaines de la biologie et de l'immunologie. Plus particulièrement, la présente invention décrit de nouvelles vésicules membranaires dont la composition a été modifiée de manière déterminée. En particulier, la présente invention décrit une nouvelle méthode permettant la production, à façon, de vésicules exprimant des molécules du complexe CMH de composition connue, éventuellement complexées à des peptide antigéniques de structure déterminée. La présente invention permet donc de modifier la composition de vésicules membranaires de façon contrôlée, et donc de créer des produits particulièrement avantageux sur le plan thérapeutique, diagnostique ou même expérimental.

Ainsi, les vésicules décrites jusqu'à présent comportent, dans le meilleur des cas, les molécules du CMH endogènes, c'est-à-dire les molécules du CMH exprimées par la cellule dont elles sont issues. De ce fait, ces molécules sont de structure variée, pas toujours identifiées, et généralement multiples, selon le type HLA de l'organisme dont elles sont issues. Au contraire, la présente invention permet de produire des vésicules membranaires portant des molécules du CMH de composition définie. En outre, les vésicules de l'invention présentent l'avantage d'être très riches en molécules du CMH ainsi déterminées, et d'offrir un puissant pouvoir immunogène.

La présente invention concerne notamment des vésicules membranaires comprenant des molécules de structure prédéterminée, notamment des molécules du CMH de structure prédéterminée. La présente invention concerne en particulier des vésicules membranaires comprenant des complexes CMHpeptide de structure prédéterminée. La présente invention concerne également une méthode de modification de la composition d'une vésicule membranaire comprenant l'introduction, dans une cellule productrice d'une telle vésicule, d'un acide nucléique comprenant une région hybride composée d'une région codante fusionnée à une région d'adressage, ou d'un acide nucléique codant pour une protéine ou polypeptide qui, seule ou associée à une ou plusieurs protéines, est naturellement adressée dans ces vésicules membranaires.

La présente invention concerne également des vésicules membranaires comprenant des molécules antigéniques définies, ancrées dans la partie membranaire. De telles molécules peuvent être exposées à l'extérieur des vésicules ou, au contraire, renfermées dans la fraction cytosolique. La présente invention concerne encore des vésicules membranaires comprenant des molécules de structure prédéterminée, exposées à leur surface, permettant leur purification, notamment par des méthodes d'affinité. La présente

invention concerne aussi des vésicules membranaires telles définies ci-dessus comprenant en outre un marqueur. Un tel marqueur permet notamment la détection des vésicules dans un échantillon, par exemple leur suivi in vivo.

L'invention concerne également un procédé de préparation des vésicules définies ci-dessus, ainsi que l'utilisation de ces vésicules. Ainsi, ces vésicules peuvent être utilisées comme immunogène, pour la préparation d'anticorps. De manière particulièrement avantageuse, ces vésicules sont utilisées pour produire des anticorps restreints au CMH, c'est-à-dire, spécifique d'un complexe peptide-molécule du CMH.

Un premier objet de l'invention réside plus particulièrement dans une vésicule membranaire, caractérisée en ce qu'elle comporte une molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité.

Le terme vésicule membranaire désigne au sens de l'invention notamment toute vésicule composée d'une bicouche lipidique renfermant une fraction cytosolique. Ces vésicules sont généralement produites par relargage, à partir de cellules, et sont de ce fait également désignées dans la présente demande par le terme "exosome". Les vésicules membranaires (ou exosomes) selon l'invention ont généralement un diamètre de 60 à 80 nm environ. En outre, ces vésicules portent, avantageusement, des protéines membranaires qui sont dans la même orientation que dans la membrane plasmique des cellules dont elles sont issues.

La présente invention montre maintenant qu'il est possible de modifier la composition des exosomes, de manière contrôlée et spécifique. Plus particulièrement, la présente invention montre qu'il est possible de produire des vésicules membranaires exprimant des complexes moléculaires recombinants de composition (pré)déterminée. Comme illustré plus loin dans la présente description, de telles vésicules présentent des propriétés particulièrement avantageuses, tant sur le plan thérapeutique que diagnostique et expérimental.

La présente invention découle tout d'abord de la sélection de populations cellulaires particulières pour la production des vésicules membranaires. La présente invention résulte également de la mise en évidence qu'il est possible d'introduire dans ces cellules, par voie génétique, des molécules recombinantes, et que ces molécules sont ensuite exprimées de manière fonctionnelle et dense dans les exosomes.

L'un des premiers éléments de l'invention réside donc dans la définition et l'identification de la population cellulaire utilisée pour la production des vésicules membranaires. Avantageusement, la cellule utilisée est une cellule comportant des vésicules internes de sécrétion, cultivable, modifiable génétiquement, et,

préférentiellement, dont les vésicules internes peuvent être sécrétées sous l'effet d'une stimulation externe. Il s'agit essentiellement de cellules de mammifère, en particulier de cellules animales, mais également de cellules d'origine humaine. Par ailleurs, il peut s'agir de cultures primaires ou de lignées immortalisées.

5 De manière particulièrement avantageuse, les cellules de départ sont essentiellement dépourvues de molécules du CMH, c'est-à-dire n'expriment pas ou peu de molécules du CMH endogène. Cette caractéristique peut s'avérer très importante dans certaines applications, comme il sera illustré plus loin.

10 Différents types de cellules productrices d'exosomes ont été décrits dans la littérature, tels que par exemple les cellules dendritiques ou les lymphocytes B. Néanmoins, ces cellules sont généralement difficiles à transfecter et riches en molécules du CMH endogènes. De ce fait, bien qu'elles puissent être utilisées pour la mise en oeuvre de l'invention, les vésicules de la présente invention sont plus préférentiellement susceptibles d'être obtenues à partir de cellules de mastocytes ou dérivées de mastocytes.

15 Dans un mode de réalisation particulier, les vésicules membranaires selon l'invention sont préférentiellement préparées à partir de cellules de mastocytes ou dérivées de mastocytes.

Les mastocytes regroupent un ensemble de types cellulaires dérivés de précurseurs médullaires, résidant, après différenciation, dans des épithélia comme la peau, le poumon, l'intestin ou la rate (Smith et Weis, Immunology Today 17 (1996) 60). Ces cellules se caractérisent essentiellement par le fait que leur cytoplasme est majoritairement constitué de granules qui contiennent de l'histamine, ainsi que de l'héparine ou des protéases, et en ce qu'elles expriment à leur surface des récepteurs de haute affinité pour les immunoglobulines E (IgE). En outre, un autre avantage de l'utilisation de mastocytes selon l'invention réside dans la possibilité de déclencher (en particulier de stimuler fortement) l'exocytose (i.e., la libération) des exosomes par différents traitements. Ainsi, il est possible de réguler la production des vésicules par traitement en présence d'un ionophore calcique ou, de manière plus physiologique, par la stimulation des récepteurs de haute affinité pour les IgE.

30 Ces cellules présentent des propriétés particulièrement avantageuses pour la mise en oeuvre de la présente invention, à savoir la présence de vésicules internes de sécrétion, la possibilité de les cultiver et d'induire une exocytose massive. En outre, il a maintenant été montré, comme décrit dans les exemples, que ces cellules peuvent également être modifiées génétiquement de manière stable, ce qui représente une propriété
35 particulièrement avantageuse pour la mise en oeuvre de la présente invention.

Plus spécifiquement, les vésicules selon l'invention ont un diamètre de 60 à 80 nm environ, et sont produites à partir de cellules de mastocytes ou dérivées de mastocytes.

Dans un mode préféré, les vésicules membranaires de l'invention sont essentiellement dépourvues de molécules du CMH endogènes. L'absence de molécules endogènes du CMH (c'est-à-dire de molécules du CMH de la cellule productrice des vésicules) peut être mise en évidence au moyen d'anticorps spécifiques, par les techniques classiques. Elle peut également être mise en évidence par la sélectivité des anticorps obtenus par immunisation avec les vésicules. Comme indiqué dans les exemples, les vésicules de l'invention sont, dans un mode particulièrement avantageux, capables d'induire, chez l'animal, une production d'anticorps spécifiques des molécules recombinantes définies exprimées par elles, sans détection d'anticorps dirigés contre les cellules non modifiées génétiquement. Le terme "essentiellement" dépourvu désigne le fait que certaines molécules du CMH peuvent être présentes en quantités très faibles, difficilement détectables par les méthodes classiques, et sans interférence notable sur la spécificité antigénique des vésicules de l'invention.

Des vésicules membranaires particulières selon l'invention sont plus spécifiquement caractérisées par les propriétés suivantes:

- elles sont essentiellement dépourvues de molécules du CMH endogènes,
- elles portent une ou des molécules recombinantes de structure définie, par exemple

des complexes peptide-CMH recombinants, de composition définie.

De telles vésicules de l'invention sont avantageusement produites à partir de cellules dérivées de mastocytes, qui sont essentiellement dépourvues de molécules du CMH endogènes. A cet égard, il est connu que les mastocytes accumulent dans leur granules de sécrétion des molécules de classe II du CMH. En particulier, les mastocytes sont capables d'accumuler de manière préférentielle les complexes CMH-II-peptide dans des compartiments intracellulaires multivésiculaires particuliers, les granules de sécrétion (Raposo et al., Mol. Biol. Cell 8 (1997) 2619). Ces cellules, prélevées chez un mammifère, comportent donc des molécules du CMH endogènes. De manière particulièrement avantageuse, on utilise dans le cadre de la présente invention des lignées de cellules dérivées de mastocytes, essentiellement dépourvues de molécules du CMH endogènes. Différentes lignées de cellules mastocytaires ont été décrites dans la littérature. La présente demande montre maintenant que certaines de ces lignées possèdent des niveaux faibles de molécules du CMH, et sont donc particulièrement avantageuses pour la mise en oeuvre de l'invention. A titre illustratif, on peut citer notamment des lignées dérivées des cellules RBL (Rat Basophilic Leukemia), déposées à

l'ATCC sous le numéro CRL1378 (Kulczycki et al., J. Exp. Med. 139 (1974) 600), la lignée KU-812 (Butterfield et al., Leukemia Res. 12 (1988) 345), ou encore des cellules d'une lignée de mastocytes immatures humains, telle que la lignée HMC (Nilsson et al., Scand. J. Immunol. 39 (1994) 489). Un exemple particulier de lignée est la lignée RBL - 2H3 (Barsumian et al, Eur. J. Immunol. (1 1 (1 981) 317). Il est entendu que toute autre cellule présentant les propriétés énoncées ci-dessus peut être mise en oeuvre.

Dans le cadre de la présente invention, l'expression "composition définie" désigne plus particulièrement le fait que les vésicules de l'invention possèdent par exemple une grande spécificité antigénique et d'haplotype. Ainsi, les vésicules décrites dans l'art antérieur expriment généralement des molécules du CMH d'haplotypes divers et inconnus. Au contraire, les vésicules préférées de l'invention expriment des molécules recombinantes dont l'haplotype est prédéterminé de manière précise. Le terme "recombinant" indique que la molécule résulte de l'expression, dans la cellule productrice des vésicules, d'un acide nucléique recombinant codant pour cette molécule. Les vésicules membranaires selon la présente invention sont donc plus préférentiellement produites à partir de cellules, établies en lignées, qui sont modifiées génétiquement pour exprimer des constituants de structure prédéterminée.

Comme indiqué ci-avant, les vésicules de l'invention expriment avantageusement des molécules définies du CMH.

Les molécules du CMH humain se regroupent dans deux classes distinctes, les molécules du CMH de classe I et les molécules du CMH de classe II.

Dans un mode particulier de réalisation, les vésicules selon l'invention expriment une ou plusieurs molécules recombinantes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II. A cet égard, les molécules du CMH humain de classe II sont composées de deux chaînes, une chaîne α et une chaîne β , la chaîne β conférant la spécificité allélique au complexe.

Dans une variante spécifique, les vésicules selon l'invention expriment plus particulièrement une chaîne α recombinante d'une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II. Dans une autre variante spécifique, les vésicules selon l'invention expriment plus particulièrement une chaîne α et une chaîne β recombinantes d'une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II.

Différents types de molécules du CMH II humaines ont été identifiés, caractérisés et séquences (voir par exemple Immunogenetics 36 (1992) 135). On peut citer à titre préférentiel les molécules de type DR1 à DR13, notamment DR1, DR2, DR3, DR4, DR5, DR6 et DR7. L'ADN codant pour les DR humains, en particulier les DR1 à 13, peut être

aisément isolé à partir de cellules, banques ou plasmides par les techniques classiques de biologie moléculaire. Ces séquences ont notamment été décrites dans Bodmer et al. (Tissue antigens 44 (1994) 1). De préférence, les exosomes selon l'invention expriment donc une molécule du CMH de classe II comprenant une chaîne α et une chaîne β sélectionnées parmi les haplotypes DR1 à DR13, encore plus préférentiellement DR1 à DR7.

Dans un exemple spécifique, l'invention concerne toute vésicule membranaire comprenant une chaîne α et/ou β recombinante d'une molécule du CMH-II d'haplotype DR1.

Dans un autre mode de réalisation, les vésicules selon l'invention expriment une ou plusieurs molécules recombinantes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I. Les molécules du CMH classe I sont composées également de deux chaînes, la chaîne α transmembranaire et polymorphique, et la β 2-microglobuline, qui est constante et soluble. Chez l'homme, trois locus génétiques codent pour la chaîne α , désignés A, B et C. Dans les molécules de CMH-I classiques, chaque locus A, B et C de la chaîne α est soumis à une variation allélique. Ainsi, on dénote les allèles A1, A2, A3, etc. A10, B1, B7, B37, B54, etc., CW3, CW6, etc. (voir par exemple Bodmer et al. précitée et Immunogenetics 36, 1992, précitée).

Préférentiellement, les exosomes de l'invention expriment une chaîne α d'une molécule du CMH-I classique, c'est-à-dire transmembranaire et polymorphique. Encore plus préférentiellement, il s'agit d'une chaîne α d'une molécule du CMH-I d'allèle A1, A2 ou A3.

Dans un mode particulier de mise en oeuvre, les exosomes selon l'invention expriment une chaîne α d'une molécule du CMH-I non-classique, c'est-à-dire non-polymorphique. En effet, par opposition aux CMH-I dits "classiques", soumis à un polymorphisme important, il existe chez l'homme des molécules du CMH-I "non-classiques", qui sont essentiellement non polymorphiques. De telles molécules ont par exemple été décrites dans Bendelac et al. (Ann. Rev. Immunol. (1997) 535). Un exemple préféré de CMH-I non-classique selon l'invention est représenté par la molécule Cd 1.

Il est entendu que tout autre molécule du CMH-I humain peut être exprimée dans le cadre de la présente invention.

Dans un exemple spécifique, l'invention concerne donc toute vésicule membranaire comprenant une protéine recombinante d'une molécule du CMH-I.

Dans une variante particulière, les vésicules de l'invention comportent plusieurs molécules du CMH de classe I et/ou II. Ainsi, une vésicule avantageuse comporte par exemple 2 molécules du CMH-II d'haplotypes différents, ou plus. Toute autre combinaison de molécules du CMH est bien entendu possible, telle que par exemple des CMH-I et CMH-II.

Les vésicules de l'invention exprimant un ou plusieurs complexes du CMH définis sont particulièrement avantageuses puisqu'elles permettent de présenter un peptide antigénique donné, dans un contexte MHC défini. A cet égard, dans un mode plus préféré de l'invention, les vésicules membranaires comportent un complexe entre un peptide défini et la molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité.

Les vésicules de l'invention peuvent par ailleurs comporter une ou plusieurs autres molécules d'intérêt, hétérologues, en plus ou à la place des molécules du CMH mentionnées ci-dessus. A cet égard, dans une variante particulière, l'invention concerne des vésicules membranaires produites à partir de cellules de mastocytes ou dérivées de mastocytes, caractérisées en ce qu'elles comportent une ou des molécules hétérologues d'intérêt. Le terme cellule "dérivée" de mastocytes désigne des lignées transformées et/ou immortalisées et/ou obtenues à partir de cellules de mastocytes ou de basophiles et présentant des propriétés de cellules de mastocytes (accumulation de vésicules internes de sécrétion). Le terme "hétérologue" indique que la molécule d'intérêt n'est pas présente, sous cette forme, dans les exosomes de l'invention à l'état naturel.

Les molécules d'intérêt portées par ou contenues dans les exosomes de l'invention peuvent être toute protéine, polypeptide, peptide, acide nucléique, lipide, ainsi que toute substance d'intérêt (de nature chimique, biologique ou synthétique). Ces molécules peuvent être de nature recombinante, et être introduites dans la cellule productrice ou directement dans/sur les exosomes. Des types plus particulièrement préférés de molécules d'intérêt sont notamment des molécules du CMH, des antigènes (entiers ou sous forme de peptides), des ligands de récepteurs, des récepteurs (spécifiques) de ligands, des acides nucléiques, des produits pharmacologiques, des marqueurs ou encore des peptides ou protéines permettant une purification des vésicules.

Comme antigène, on peut citer plus particulièrement toute protéine, notamment cytoplasmique, d'origine virale ou tumorale. A titre d'exemples préférés de protéines d'origine virale, on peut citer notamment toute protéine cytoplasmique ou membranaire exprimée par les virus EBV, CMV, VIH, rougeole, hépatite, etc. Il s'agit plus préférentiellement des protéines cytoplasmiques, c'est-à-dire essentiellement invisibles au système immunitaire dans le processus d'infection classique, et donc faiblement

immunogènes dans les conditions naturelles ou également de protéines ou fragments de protéines membranaires. A titre d'exemples préférés de protéines d'origine tumorale, on peut citer notamment les protéines p53 (sauvage ou toute forme mutée présente dans une tumeur), MAGE (notamment MAGE 1, MAGE 2, MAGE 3, MAGE 4, MAGE 5 et
5 MAGE 6), MART (notamment MART 1), la Gp100, les protéines ras (p21 sauvage ou mutées), etc. Il est entendu que toute autre protéine d'intérêt peut être exprimée dans ou à la surface des exosomes de l'invention, en suivant l'enseignement de la présente demande.

A cet égard, les molécules antigéniques recombinantes peuvent être présentes soit à la surface des vésicules (exposées), soit à l'intérieur des vésicules. En effet, de manière
10 particulièrement surprenante, les inventeurs ont montré que des vésicules de l'invention contenant, dans leur cytosol, un antigène recombinant (notamment p53) étaient capables d'induire, chez l'animal, une production très élevée d'anticorps dirigés contre cet antigène.

Parmi les récepteurs de ligands, on peut citer, de manière générale, tout récepteur de ligand naturel ou issu de manipulations génétiques. En particulier, il peut s'agir de tout
15 récepteur d'hormone, facteur de croissance, lymphokine, facteur trophique, antigène, etc. On peut citer plus particulièrement les récepteurs des interleukines IL1 à IL15, le récepteur de l'hormone de croissance, ou le récepteur de facteurs de stimulation de colonies de granulocytes et/ou macrophages (G-CSF, GM-CSF, CSF, etc). Un exemple particulier de récepteur de ligand est composé d'un anticorps simple-chaîne (ScFv), qui
20 permet l'interaction avec un ligand spécifique. Un autre exemple particulièrement avantageux au sens de l'invention est représenté par le récepteur à l'antigène des lymphocytes T (TcR). Des exosomes de l'invention exprimant à leur surface un ou plusieurs TcR définis constituent des outils d'analyse et de diagnostic particulièrement avantageux, comme il sera détaillé plus loin.

25 Comme produit pharmaceutique, on peut citer toute substance active, de nature chimique, telle que par exemple des produits pharmaceutiques préparés par les techniques de chimie conventionnelles. On peut également citer toute protéine, polypeptide ou peptide ayant une activité biologique, tel que par exemple une toxine, une hormone, une cytokine, un facteur de croissance, une enzyme, un suppresseur de tumeur, etc.

30 L'acide nucléique peut être tout ADN ou ARN codant pour une protéine, polypeptide ou peptide pharmacologique tel que mentionné ci-dessus, ainsi que tout autre acide nucléique présentant une propriété particulière (antisens, antigène, promoteur, répresseur, site de liaison d'un facteur transcriptionnel, etc.). Il peut s'agir d'un oligonucléotide, d'une phase codante, d'un chromosome artificiel, etc.

Les vésicules de l'invention portant un récepteur de ligand peuvent être utilisées pour la détection de toute interaction de type récepteur-ligand, en particulier de faible affinité, dans tout échantillon biologique, comme il sera expliqué plus en détails dans la suite du texte. D'autre part, de telles vésicules peuvent également être utilisées pour véhiculer les substances d'intérêt (protéine, peptide, nucléique acide, substance chimique, etc.) vers des cellules. Ainsi, les exosomes de l'invention peuvent être utilisés, de manière générale, pour le transport et le transfert de toute molécule dans des cellules, in vitro, ex vivo ou in vivo. L'invention concerne donc toute vésicule telle que décrite ci-avant comprenant une molécule hétérologue d'intérêt, utilisable comme vecteur de transfert de ladite molécule dans une cellule.

Dans un mode plus préféré, les exosomes de l'invention sont utilisés pour le transfert orienté de substances d'intérêt vers des populations cellulaires sélectionnées. Ainsi, il est possible de préparer des vésicules de l'invention comportant une substance d'intérêt (une toxine, une hormone, une cytokine, un acide nucléique recombinant, etc.) et exprimant à sa surface un récepteur de ligand ou un ligand de récepteur, et de mettre en contact lesdites vésicules avec des cellules exprimant le ligand ou le récepteur correspondant. Cette approche permet donc un transfert ciblé et efficace.

A cet égard, un objet particulier de l'invention réside dans une vésicule telle que définie ci-avant, caractérisée en ce qu'elle exprime un récepteur de ligand et en ce qu'elle comporte une molécule hétérologue d'intérêt.

Les vésicules de l'invention peuvent en outre comporter un peptide ou une protéine recombinant permettant une purification des vésicules. Ainsi, l'invention décrit en effet la possibilité de modifier génétiquement la composition des exosomes, et donc de leur faire exprimer une molécule "étiquette" particulière, permettant sa purification. En particulier, il est possible d'obtenir un exosome exposant un peptide de structure particulière, qui peut être aisément détecté et capté par une molécule réceptrice. Dans un exemple particulier, un exosome est produit comportant, dans sa structure, une molécule peptidique comprenant le motif His6 (i.e., 6 résidus histidine consécutifs). La présence d'un tel résidu à la surface des exosomes permet leur purification aisée sur support fonctionnalisé avec du nickel. D'autres peptides recombinants de ce type peuvent être utilisés, comme par exemple le tag c-myc, VSV ou HA.

Enfin, dans une variante particulière, les vésicule selon l'invention comportent en outre un marqueur. Le marqueur peut être de nature différente (enzymatique, fluorescent, radioactif, etc.) et présent dans la vésicule ou à sa surface. Un marquage préféré est non-radioactif, comme par exemple un marquage fluorescent. Plus préférentiellement, le

marquage utilisé est un fluorochrome ou une enzyme à substrat chromogénique. Le marquage peut être réalisé directement sur la cellule productrice, ou bien sur les exosomes produits.

L'invention concerne également toute composition comprenant une ou plusieurs vésicules membranaires telles que définies ci-dessus. Les compositions de l'invention peuvent en outre comprendre une pluralité de vésicules membranaires telles que définies ci-dessus, portant des molécules recombinantes différentes. En particulier, une composition selon l'invention peut comprendre des vésicules membranaires telles que définies ci-dessus, portant des molécules recombinantes du CMH d'haplotypes différents en association avec un même peptide antigénique. Il peut s'agir également de compositions comprenant des vésicules membranaires telles que définies ci-dessus, portant des molécules recombinantes du CMH d'un même haplotype, associées à différents peptides antigéniques, par exemple. D'autres combinaisons de vésicules selon l'invention sont bien entendu possibles.

Les compositions de l'invention comprennent généralement un véhicule tel qu'une solution tampon, saline, physiologique, etc., permettant de préserver la structure des vésicules. Elles peuvent en outre comprendre tout agent stabilisant, tensio-actif, etc., de préférence compatible avec un usage biologique (in vitro ou in vivo). Ces compositions peuvent être conditionnées dans tout dispositif approprié, tel que tube, flacon, ampoule, flasque, poche, etc, et stockées à 4°C ou à -20°C, par exemple. Des compositions typiques selon l'invention comprennent de 5 à 500µg d'exosomes, par exemple de 5 à 200 µg.

Les vésicules de l'invention sont obtenues à partir de cellules génétiquement modifiées. Comme indiqué plus haut, la présente invention résulte en effet de la mise en évidence qu'il est possible d'introduire dans certaines cellules, par voie génétique, des molécules recombinantes, et que ces molécules sont ensuite exprimées de manière fonctionnelle et dense dans les exosomes.

Pour la production des vésicules de l'invention portant des molécules recombinantes de composition déterminée, une première étape consiste donc à introduire, dans une cellule productrice de vésicules, telle que définie ci-dessus, les constructions génétiques permettant l'expression de la (ou des) molécule(s) recombinante(s) sélectionnée(s).

Les constructions génétiques utilisées pour la production des cellules peuvent comprendre, de manière générale, une région codante placée sous le contrôle d'un promoteur fonctionnel dans la cellule utilisée (cassette d'expression).

Généralement, le promoteur utilisé est donc un promoteur fonctionnel dans les cellules mammifères. Il peut s'agir d'un promoteur viral, cellulaire ou bactérien, par exemple. Il peut s'agir d'un promoteur constitutif ou régulé, de préférence permettant une expression à des niveaux élevés de protéine dans la cellule. Parmi les promoteurs utilisables, on peut citer à titre d'exemple le promoteur précoce immédiat du cytomégalo virus (CMV), le promoteur du SV40, le promoteur du gène de la thymidine kinase, notamment HSV-1 TK, le promoteur du LTR d'un rétrovirus, notamment LTR-RSV, ou encore un promoteur endogène fort des cellules de mastocytes. Un mode de réalisation particulièrement préféré comprend l'utilisation du promoteur SR α , tel que décrit plus en détails dans les exemples.

La région codante utilisée est généralement composée d'un ADN, complémentaire, génomique ou synthétique (par exemple modifié pour comporter certains introns ou pour avoir un usage de codons préférentiel). Plus généralement, il s'agit d'un ADNc. Cet acide nucléique peut être obtenu par toutes les techniques connues de la biologie moléculaire, et notamment par criblage de banque, amplification, synthèse, coupures et ligatures enzymatiques, etc.

Selon le type de région codante utilisée, certaines modifications peuvent par ailleurs être apportées à la construction. Ainsi, il peut être particulièrement avantageux dans certains cas d'introduire dans la région codante une séquence de signalisation, permettant d'adresser le produit d'expression dans un compartiment particulier de la cellule, en particulier vers un compartiment membranaire (interne, plasmique, etc.). Ce signal d'adressage peut être positionné en amont (5'), en aval (3') ou à l'intérieur de la région codante. Préférentiellement, le signal d'adressage est positionné en 3' de la région codante, plus particulièrement dans sa région cytoplasmique, et en phase de lecture avec la région codante. L'emploi d'un signal d'adressage peut être particulièrement utile pour favoriser l'accumulation du produit d'expression dans ou à la surface d'un compartiment intracellulaire donné, notamment dans ou à la surface des vésicules de sécrétion. Ce mode de mise en oeuvre est particulièrement adapté à l'expression d'une molécule telle qu'un peptide étiquette, un antigène, une molécule du CMH-I ou encore un ligand de récepteur. En revanche, de manière particulièrement avantageuse, la présente demande montre que des molécules du CMH-II humaines peuvent être exprimées directement, sans ajout de signal particulier, dans des vésicules sécrétrices de cellules de mastocytes, même xénogéniques.

Pour la mise en oeuvre de la présente invention, il est possible en particulier d'utiliser comme signal d'adressage un fragment d'acide nucléique ayant la séquence d'une

partie des gènes suivants : Lampl, CD63, LIMPII, Cd1c, FcγR. Ces gènes comportent en effet des régions codant pour des signaux d'adressage de la protéine vers les compartiments de l'endosome des cellules (Sandoval et Bakke, Trends in Cell Biol. 4 (1994) 292). Un signal d'adressage utilisable dans la présente invention répond par exemple à la formule G-Y-X-X-I, dans laquelle X représente tout résidu d'acide aminé. Un signal d'adressage particulièrement adapté à la présente invention est composé du peptide signal de la protéine LAMP1 de séquence SHAGYQTI. Un autre type de signal permettant l'adressage vers les compartiments membranaires, comprend tout ou une partie d'une région transmembranaire de protéine.

L'adressage du produit d'expression vers les compartiments cellulaires permettant la présence de ce produit dans les exosomes peut également être réalisé en fusionnant la région codante à tout ou partie d'une région codant une protéine membranaire ou transmembranaire, notamment une protéine membranaire ou trans-membranaire exprimée dans les exosomes. Dans ce contexte, un mode particulier de réalisation de l'invention comprend l'introduction d'un produit recombinant dans un exosome par expression de ce produit dans la cellule productrice, sous forme d'une fusion avec une protéine membranaire ou trans-membranaire. Un exemple particulier de telle protéine est par exemple la protéine recombinante du CMH introduite dans la cellule productrice, notamment une chaîne beta, de préférence une chaîne bêta du CMH de classe II. Ainsi, les résultats présentés dans les exemples montrent qu'une telle fusion permet d'accumuler efficacement tout polypeptide d'intérêt dans un exosome, sans altérer ses propriétés ni celles de la molécule du CMH. Cet aspect de la présente invention constitue un nouveau concept de vectorisation de produits recombinants dans un exosome, et peut être appliqué à tout produit recombinant, introduit dans tout type d'exosome. A cet égard, l'invention concerne donc tout exosome comprenant une molécule recombinante de fusion entre un polypeptide d'intérêt et un signal d'adressage. Il peut s'agir d'un exosome produit à partir d'une cellule de mastocyte, dendritique, tumorale ou également d'un lymphocyte B, par exemple. Le polypeptide d'intérêt peut être un antigène (ou fragment d'antigène) ou tout autre produit biologique d'intérêt. Le signal d'adressage peut être tout peptide, polypeptide ou protéine ayant la propriété de diriger le produit de fusion vers un compartiment membranaire, notamment intracellulaire, tel que défini ci-avant. Il s'agit avantageusement d'une chaîne d'une molécule du CMH.

Dans un mode particulier de l'invention, ces vésicules sont produites par introduction dans la cellule productrice d'un acide nucléique chimère, codant une

protéine de fusion comprenant le produit recombinant lié à l'extrémité C-terminale d'une chaîne bêta d'une molécule du CMH, de préférence du CMH de classe II.

Dans les constructions utilisées, la région codante est liée de manière fonctionnelle au promoteur, de manière à permettre son expression dans les cellules.

5 Par ailleurs, les constructions de l'invention peuvent avantageusement comprendre une région, placée en 3' de la région codante, qui spécifie un signal de fin de transcription (région polyA par exemple).

10 Les cassettes d'expression selon l'invention font avantageusement partie d'un vecteur, de type plasmidique, viral, épisomal, chromosome artificiel, etc. A cet égard, un tel vecteur comprend avantageusement un système permettant la sélection des cellules le contenant. En particulier, les vecteurs comprennent avantageusement un gène codant pour un produit conférant une résistance à un agent, par exemple à un antibiotique (ampicilline, hygromycine, généticine, néomycine, zéocine, etc.). Dans un mode particulier de mise en oeuvre, chaque vecteur comporte une seule cassette d'expression
15 telle que décrite ci-avant. Dans ce mode de réalisation, les cellules sont donc modifiées par introduction de plusieurs vecteurs, lorsque plusieurs molécules sont à exprimer dans les vésicules (par exemple une chaîne α et une chaîne β de CMH-II). Dans ce mode de réalisation chaque type de vecteur utilisé comprend avantageusement un système de sélection différent, permettant de sélectionner aisément de multiples transfectants.

20 Dans un autre mode de réalisation, un vecteur peut comprendre plusieurs cassettes d'expression telles que définies ci-avant, par exemple l'une codant une chaîne α et l'autre, une chaîne β de CMH-II.

25 Les vecteurs utilisés sont préférentiellement de type plasmidique, et comportent par exemple une origine de répllication bactérienne permettant leur manipulation et leur production aisées in vitro. De tels vecteurs peuvent notamment être construits à partir de plasmides de type pBR322, pUC, pBS, pSR, etc.

30 Pour la production d'exosomes selon l'invention, des cellules modifiées génétiquement sont donc mises en oeuvre, exprimant les molécules sélectionnées. Ces cellules modifiées génétiquement sont préparées par introduction, dans des cellules choisies comme défini ci-dessus, des constructions génétiques définies ci-avant.

L'introduction des constructions génétiques peut être réalisée de différentes façons, essentiellement selon le type de cellule utilisé. Ainsi, le transfert des acides nucléiques peut être réalisé par toute technique connue telle que électroporation, précipitation au phosphate de calcium, agent chimique (peptide cationique, polymères, lipides, etc.),
35 balistique, etc. Dans le cas de vecteurs viraux, le transfert est généralement obtenu par

simple infection des cellules. Les quantités de vecteur utilisées peuvent par ailleurs être adaptées par l'homme du métier en fonction du type de transfert et des cellules utilisées. A cet égard, une méthode particulièrement efficace pour l'introduction des acides nucléiques dans les mastocytes comprend l'électroporation des vecteurs.

5 D'autre part, lorsque plusieurs constructions (vecteurs) doivent être introduites dans les cellules, celles-ci peuvent être transférées simultanément ou de manière séquentielle.

Après transfert, les cellules ayant effectivement incorporé les acides nucléiques sont sélectionnées et clonées sur la base de leur résistance à un composé (e.g., antibiotique) grâce au gène de résistance présent dans l'ADN ayant été transféré. Ces cellules peuvent
10 être utilisées extemporanément pour la production d'exosomes de l'invention, ou bien être stockées en vue d'une utilisation ultérieure. A cet égard, les cellules peuvent être conservées à 4°C dans un milieu de conditionnement usuel pendant une période suffisante pour permettre différents lots de production d'exosomes. Les cellules peuvent également être conservées sous forme congelée (par exemple dans l'azote), en vue d'utilisations
15 ultérieures. A cet égard, il est ainsi possible selon la présente invention de constituer des banques de cellules productrices d'exosomes ayant des propriétés particulières. En particulier, il est possible selon l'invention de constituer des banques de cellules exprimant les principaux types HLA des molécules de classe II du CMH. De ce fait, il est alors possible, selon les applications envisagées et selon le type HLA du sujet, de choisir
20 dans la banque les cellules productrices des molécules du CMH correspondant, sans devoir reconstruire ces cellules au cas par cas.

A cet égard, un objet particulier de l'invention réside dans une cellule productrice d'exosomes telle que définie ci-avant, en particulier une cellule de mastocyte, caractérisée en ce qu'elle comporte un acide nucléique recombinant codant pour une
25 molécule du complexe majeur d'histocompatibilité. L'invention concerne aussi toute cellule productrice d'exosomes telle que définie ci-avant, en particulier une cellule de mastocyte, caractérisée en ce qu'elle comporte un acide nucléique recombinant codant pour une chaîne invariante Ii, notamment modifiée pour comprendre un peptide antigénique à la place de la région CLIP, ou pour un peptide permettant la purification
30 de l'exosome.

Plus particulièrement, il s'agit d'une cellule mammifère, notamment d'origine animale, en particulier de rongeur. Il peut également s'agir d'une cellule d'origine humaine. Dans un mode plus particulier, il s'agit d'une lignée cellulaire dérivée d'un mastocyte, telle que notamment une lignée mastocytaire d'une leucémie à basophile. A

titre d'exemple particulier, on peut citer les cellules de la lignée RBL, notamment RBL-2H3, les cellules de la lignée KU-812 ou HMC-1.

Préférentiellement, l'acide nucléique recombinant code pour une chaîne α et/ou β d'une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II et/ou pour une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I. Dans un autre mode de réalisation, la cellule comprend plusieurs acides nucléiques codant respectivement pour une chaîne α et une chaîne β d'une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II.

La présente invention permet de produire, de manière simple et reproductible, des quantités importantes d'exosomes de composition connue. Pour la production des exosomes, les cellules modifiées génétiquement décrites ci-dessus sont cultivées dans un milieu approprié, et les exosomes sont récupérés.

Un objet particulier de l'invention réside ainsi dans un procédé de production d'un exosome comportant une molécule recombinante définie, comprenant les étapes suivantes:

a) la culture d'une cellule de mastocyte ou dérivée de mastocyte comportant un acide nucléique recombinant codant pour ladite molécule recombinante définie,

c) la récupération des exosomes produits par lesdites cellules, ces exosomes comprenant ladite molécule recombinante définie.

Avantageusement, le procédé selon l'invention comprend en outre une étape intermédiaire b) au cours de laquelle les cellules sont stimulées pour induire et/ou augmenter la sécrétion des exosomes.

D'autre part, le procédé de l'invention permet la production de vésicules dans lesquelles la molécule recombinante définie est exposée à l'extérieur de l'exosome, ou est incluse, en partie ou en totalité, dans la fraction cytosolique de l'exosome.

Comme indiqué ci-avant, dans le procédé de l'invention, la molécule recombinante peut être, par exemple, une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité, une molécule antigénique, un ligand de récepteur, un récepteur de ligand ou un peptide de purification, ou tout autre polypeptide d'intérêt. En outre, comme expliqué ci-avant, dans certains modes de réalisation, l'acide nucléique utilisé dans le procédé comprend en outre une région codant pour un signal d'adressage vers les compartiments membranaires, notamment les vésicules internes de sécrétion, du mastocyte.

Un autre objet particulier de l'invention réside dans un procédé de production d'une vésicule membranaire, comprenant

- la culture d'une cellule productrice d'exosomes, comprenant un acide nucléique recombinant codant pour une molécule recombinante du CMH, en particulier de classe I ou II, notamment humaine, et

- la récupération des exosomes produits, le cas échéant après stimulation de l'exocytose.

A cet égard, l'invention concerne également un procédé de préparation d'un exosome comportant un complexe peptide-CMH de composition définie, caractérisé en ce qu'il comprend:

- la culture d'une cellule productrice d'exosomes comportant un ou plusieurs acides nucléiques recombinants codant pour une molécule recombinante définie du CMH,

- la stimulation des cellules pour induire une libération des exosomes,

- la récupération des exosomes produits par lesdites cellules, ces exosomes exprimant à leur surface ladite molécule recombinante définie du CMH, et,

- la mise en contact des exosomes avec le ou les peptides.

Pour la mise en oeuvre de l'invention, le ou les peptides utilisés peuvent être des peptides de synthèse, des mélanges de peptides, des extraits cellulaires, par exemple un mélange de peptides extrait de cellules tumorales. Le ou les peptides peuvent être sous forme isolée, ou purifiée ou, comme indiqué cidessus, de mélange. Par ailleurs, après mise en contact des exosomes avec les peptides, les exosomes peuvent être isolés ou purifiés selon les méthodes conventionnelles.

Dans une autre variante, l'invention concerne un procédé de préparation d'un exosome comportant un complexe peptide-CMH de composition définie, caractérisé en ce qu'il comprend:

- la culture d'une cellule productrice d'exosomes comportant un ou plusieurs acides nucléiques recombinants codant pour une molécule recombinante définie du CMH et un acide nucléique comprenant une région codant pour un peptide recombinant défini,

- la stimulation des cellules pour induire une libération des exosomes,

- la récupération des exosomes produits par lesdites cellules, ces exosomes exprimant à leur surface ladite molécule recombinante définie du CMH associée audit peptide recombinant.

Plus particulièrement, dans ce procédé, l'acide nucléique comprenant une région codant pour le peptide recombinant code pour un dérivé de la chaîne invariante li, dans laquelle la région CLIP a été délétée et substituée par ledit peptide. Ce mode de réalisation assure une grande spécificité dans la formation du complexe peptide-CMH.

Dans une autre variante, l'acide nucléique comprend une région codant pour le peptide et une région d'adressage vers les compartiments intracellulaires. En outre, l'acide nucléique peut comprendre plusieurs régions codant pour un même ou pour des peptides antigéniques différents.

5 Préférentiellement, les cellules productrices utilisées dans le procédé sont des cellules de mastocyte ou dérivées de mastocyte. Dans ce mode de réalisation, la stimulation des cellules pour induire une libération des exosomes est préférentiellement réalisée au moyen d'un ou plusieurs ionophores calciques, ou par des IgE.

10 Dans un mode de réalisation particulièrement préféré, les cellules productrices utilisées dans le procédé sont essentiellement dépourvues de molécules du CMH endogène.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de modification de la composition d'un exosome, comprenant

15 - l'introduction dans une cellule productrice d'exosomes d'un acide nucléique codant pour une molécule définie, liée à un signal d'adressage dans les compartiments membranaires, et

- la production d'exosomes à partir de ladite cellule.

Ce procédé permet avantageusement de produire des exosomes exprimant des molécules recombinantes définies et variées.

20 Les exosomes de l'invention peuvent être utilisés dans de nombreuses applications, telles que par exemple comme outils d'analyse, de diagnostic, thérapeutique ou expérimental. Ainsi, ils peuvent être utilisés pour l'analyse de la réponse T antigène spécifique ; pour l'étude des interactions récepteur/ligand de faible affinité où une multimérisation des différents partenaires est nécessaire afin d'augmenter l'avidité de ces
25 complexes moléculaires, dépassant ainsi le champs des applications immunologiques ; sur le plan diagnostique ou thérapeutique, ainsi que pour la production d'anticorps particuliers, notamment d'anticorps restreints au MHC. Ces différentes applications et d'autres sont illustrées ci-après.

30 a) Utilisation pour la production d'anticorps

L'une des premières applications des exosomes de l'invention réside dans la production d'anticorps. En effet, en raison de la composition définie des exosomes de l'invention, il est possible de produire des anticorps de spécificité déterminée. En outre, comme le montrent les exemples, les exosomes de l'invention ont des propriétés
35 immunogènes très fortes, notamment en raison de la densité élevée des complexes

CMH-peptide à leur surface, de leur fonctionnalité, et de leur présentation efficace au système immunitaire.

Les anticorps ainsi produits peuvent être des polyclonaux ou des monoclonaux. Ils peuvent être préparés par les techniques classiques de l'immunologie, comprenant l'immunisation d'animaux, et le prélèvement des sérums (anticorps polygonaux) et/ou la fusion des lymphocytes spléniques avec des cellules de myélomes non productrices d'immunoglobulines (pour générer des hybridomes producteurs de monoclonaux).

Un autre objet de l'invention concerne donc des anticorps ou fragments d'anticorps produits par immunisation avec des exosomes tels que décrits ci-avant. Les fragments d'anticorps peuvent être par exemple des Fab, (Fab')₂, ScFv, etc., et, plus généralement, tout fragment conservant la spécificité de l'anticorps. En particulier, l'invention concerne un procédé de préparation d'anticorps, comprenant l'immunisation d'un animal avec un exosome tel que décrit ci-avant, portant un complexe peptide-CMH défini et la récupération des anticorps et/ou des cellules produisant des anticorps ou impliquées dans la réponse immunitaire. Avantagusement, le procédé de l'invention permet la production d'anticorps monoclonaux, notamment restreints au CMH, c'est-à-dire spécifiques de l'association CMH-peptide. De préférence, dans le procédé de l'invention, on utilise des exosomes essentiellement dépourvus de molécules CMH endogènes, qui expriment des complexes recombinants CMH-peptide, et qui sont produits à partir d'une cellule autologue vis-à-vis de l'animal chez lequel l'immunisation est réalisée. Ainsi, comme montré dans les exemples, cette méthode permet d'obtenir, sans besoin d'adjuvant, des anticorps puissants dirigés contre le peptide, notamment des anticorps restreints au CMH, c'est-à-dire spécifiques du peptide dans sa conformation associée à la molécule définie du CMH. De tels anticorps sont particulièrement avantageux sur le plan expérimental, diagnostique et thérapeutique. En outre, les anticorps selon l'invention peuvent être marqués par toute technique connue (enzymatique, fluorescence, radioactive, etc), selon les méthodes connues de l'homme du Métier.

b) Applications diagnostiques

Les exosomes et anticorps de l'invention possèdent des propriétés avantageuses pour une utilisation diagnostique.

Ainsi, les anticorps ou fragments d'anticorps obtenus selon l'invention peuvent être utilisés dans toute application diagnostique, pour la détection, dans un échantillon biologique, de la présence d'antigènes spécifiques correspondants, grâce à l'emploi de

différentes techniques classiques, telles que la cytométrie de flux, l'immunohistochimie ou l'immunofluorescence, par exemple. Dans le cas particulier des anticorps restreints au MHC, ils permettent avantageusement la détection des complexes CMH-peptides correspondants, et donc le diagnostic de pathologies correspondantes. Ces anticorps peuvent notamment être appliqués au diagnostic de pathologies impliquant un défaut de réponse ou une réponse inappropriée du système immunitaire afin de déterminer l'expression d'un antigène, préalablement défini, sous une forme reconnaissable par des lymphocytes T. Par exemple et de manière non exhaustive, on peut envisager le diagnostic:

- de pathologies tumorales où la détection sur les prélèvements tumoraux de différents peptides issus de protéines comme p53, Her2, MAGE, BAGE, Mart, GP100 associées aux molécules de classe I du CMH peut permettre le phénotypage de la tumeur et faciliter le choix d'une thérapeutique ;

- de maladies virales à un stade préinfectieux ou latent, où le virion ne peut être détecté (hépatite, les infection par le VIH, le CMV et d'autres virus)

- de maladies autoimmunes comme la Sclérose en plaque, le Diabète autoimmun, la Thyroïdite autoimmune, la Polyarthrite rhumatoïde, le Lupus érythémateux disséminé, où la détection de molécules du CMH présentant des peptides dérivés d'auto-antigènes peut constituer le signe avant-coureur d'une poussée évolutive de la maladie.

Les exosomes selon l'invention sont également utilisables pour la détection de partenaires spécifiques d'une molécule protéique dans un échantillon biologique. Ainsi, les exosomes de l'invention portant des complexes CMH-peptides sont utilisables pour détecter des lymphocytes T spécifiques de ces complexes dans des échantillons biologiques, par exemple dans différentes situations pathologiques, notamment dans les pathologies décrites ci-dessus. A cet égard, les exosomes peuvent être marqués par tout système de marquage connu de l'homme du métier (enzymatique, fluorescent, radioactif, etc.) pour permettre leur détection dans des échantillons biologiques.

Dans un mode particulier, l'invention réside donc dans l'utilisation d'exosomes marqués, notamment fluorescents, tels que décrits ci-avant, pour la détection de lymphocytes T spécifiques de complexes peptide antigénique -CMH dans un échantillon biologique. L'échantillon biologique peut être tout échantillon de sang, sérum, tissu, tumeur, biopsie, peau, urine, etc. En outre, l'échantillon biologique peut être prétraité par exemple pour dissocier les cellules, amplifier les cellules en culture, préparer des fractions membranaires, etc. Avantageusement, l'échantillon biologique provient d'un organisme humain. A cet effet, l'invention concerne également une méthode pour la

détection de la présence de lymphocytes T spécifiques de complexes antigène-CMH dans un échantillon biologique, comprenant la mise en contact dudit échantillon avec un exosome marqué tel que défini ci-avant, comportant ledit complexe antigène-CMH, et la mise en évidence du marquage de lymphocytes T dans ledit échantillon.

5 De plus, la détection de ces lymphocytes T permet non seulement la détection et donc le diagnostic d'un état physiopathologique, mais également de suivre par exemple l'efficacité de protocoles d'immunisation et l'état de la réponse immunitaire à différents stades de la maladie et d'évaluer ainsi l'efficacité des thérapeutiques entreprises.

10 Dans une application particulière, les exosomes de l'invention portant un récepteur TcR sont utilisés pour la détection de complexes peptide-CMH spécifiques de ce récepteur dans un échantillon biologique.

Par ailleurs, les exosomes fluorescents selon l'invention portant n'importe quel type de protéine de composition définie représentent également des sondes fluorescentes permettant la détection de récepteurs potentiels. Le champs nouveau des exosomes est ainsi généralisable à la mise en évidence, *in vivo*, de toute interaction protéine/protéine de faible affinité. L'invention a donc également pour objet l'utilisation d'exosomes, de préférence marqués, notamment fluorescents, tels que décrits ci-avant,

15 - pour la détection de récepteurs spécifiques d'une molécule protéique dans un échantillon biologique. Dans ce mode de mise en oeuvre, les exosomes utilisés comportent donc, à leur surface, ladite molécule biologique de structure définie.

20 - pour la détection de la présence d'un ligand dans un échantillon biologique. Dans ce mode de mise en oeuvre, les exosomes utilisés comportent donc, à leur surface, un récepteur spécifique dudit ligand.

25 c) Applications thérapeutiques

Les anticorps restreints ou des fragments de ces derniers sont potentiellement capables d'inhiber l'interaction entre le récepteur d'un lymphocytes T et le complexe CMH-peptide pour lequel il est spécifique. De façon parallèle, les exosomes portant à leur surface un seul type de complexe CMH-peptide peuvent, en interagissant avec les lymphocytes T spécifiques de ces complexes, entrer en compétition avec leurs ligands naturels, les lymphocytes T et entraîner leur inactivation.

30 Les anticorps restreints et les exosomes peuvent donc être employés dans toutes les situations où l'on souhaite réduire ou supprimer une réponse immunitaire médiée par des lymphocytes T qui s'avère délétère pour l'organisme comme c'est le cas par exemple dans:

- les transplantations d'organes ou les greffes de moelles dans lesquelles on cherche à neutraliser la réponse de l'hôte contre le greffon, généralement au moyen de fortes doses d'agents immunosuppresseurs ;

- les maladies auto-immunes ou les pathologies virales pendant lesquelles la réponse immunitaire T CD8 ou CD4 aboutit de manière chronique à la destruction des tissus;

- les allergies et l'asthme.

Dans ce type de pathologies, les exosomes de l'invention exprimant à leur surface un complexe défini peptide-MHC, dont l'implication est connue dans le développement de la situation pathologique, peuvent donc être utilisés pour bloquer le développement de la réponse immune et donc le développement de la réponse pathologique.

Les exosomes de l'invention portant des complexes CMH-peptides peuvent également être utilisés pour l'amplification (l'expansion) de population de lymphocytes T cytotoxiques ex vivo. Utilisés directement à partir de prélèvement sanguins, ils peuvent ainsi être la base de thérapies cellulaires contre différentes cibles cellulaires. Ainsi les exosomes peuvent servir à trier des cellules T spécifiques de combinaisons variées de complexes exprimés par des cellules qui représentent une cible thérapeutique, comme les cellules tumorales ou infectées par un virus. Un autre objet de l'invention réside donc dans l'utilisation des exosomes décrits ci-avant pour l'amplification clonale et/ou la stimulation de lymphocytes T cytotoxiques et/ou auxiliaires. L'invention concerne également une méthode pour l'amplification (ou l'expansion) clonale ex vivo de lymphocytes T, notamment cytotoxiques, comprenant la mise en contact d'un échantillon biologique comprenant des lymphocytes T avec des exosomes tels que décrits ci-avant, comportant un complexe peptide-CMH défini, la récupération des lymphocytes T spécifiques et leur amplification. Cette méthode est tout particulièrement avantageuse pour l'amplification clonale de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de complexes entre des molécules CMH et des peptides d'antigènes tumoraux ou viraux.

Une autre application particulièrement intéressante des vésicules selon l'invention réside dans le transfert des molécules vers les cellules. En effet, de part leur composition, les vésicules de l'invention sont capables de jouer le rôle de vecteur de transfert de molécules vers les cellules, in vitro, ex vivo et in vivo. A cet égard, l'invention concerne l'utilisation des exosomes tels que décrits ci-avant, comportant une substance d'intérêt, pour la préparation d'une composition destinée au transfert de ladite substance dans une cellule. Avantageusement, il s'agit d'un exosome comportant un récepteur de ligand ou un ligand de récepteur à sa surface, permettant ainsi d'orienter le

transfert vers une ou des populations cellulaires choisies. L'invention concerne également une méthode pour le transfert d'une substance dans une cellule, in vitro, ex vivo ou in vivo, comprenant la mise en contact de ladite cellule avec une vésicule selon l'invention comportant ladite substance. Plus préférentiellement, la vésicule utilisée exprime en outre un récepteur de ligand et la méthode de l'invention permet un transfert orienté de la substance vers des cellules exprimant le ligand correspondant. Pour une mise en oeuvre in vivo, les vésicules de l'invention sont administrées à un sujet (de préférence un mammifère, notamment l'homme), par toute voie d'administration classique (injection intraveineuse, intraartérielle, intramusculaire, sous-cutanée, etc.). Pour une utilisation in vitro ou ex vivo, les cellules sont contactées par incubation dans un dispositif approprié (boîte, flasque, poche, ampoule, etc.), de préférence en conditions stériles. Les paramètres de l'étape de mise en contact (quantité de vésicule, durée de contact, température, milieu, etc.) peuvent être aisément ajustés par l'homme du métier en fonction des buts poursuivis et de l'enseignement de la présente demande.

d) Applications dans le domaine de la recherche

Elles concernent bien entendu toutes les applications évoquées plus haut dans l'analyse des mécanismes moléculaires de la présentation antigénique par l'utilisation d'anticorps permettant de détecter et d'analyser les différentes étapes de la formation de complexes CMH-peptides dans différentes situations normales ou pathologiques.

Par ailleurs, elles concernent aussi l'analyse et la caractérisation moléculaire des populations de lymphocytes T capables de reconnaître un complexe CMH-peptide déterminé par l'utilisation des exosomes fluorescents dans leur capacité à détecter de manière de récepteurs T aux complexes CMH-peptide.

Dans ces différentes applications (diagnostiques, thérapeutiques, expérimentales, production de lymphocytes T, etc.), les exosomes de l'invention peuvent être mis en oeuvre soit tels quels, soit sous forme immobilisée sur un support. Ainsi, les résultats présentés dans les exemples montrent en effet qu'il est possible de fixer les exosomes sur des supports, sans altérer leurs propriétés fonctionnelles, notamment leur spécificité antigénique par exemple. A cet égard, un objet particulier de la présente invention réside dans une composition comprenant des exosomes immobilisés sur un support. Le support est préférentiellement un support solide ou semi-solide, de type bille, filtre ou analogues. Il s'agit préférentiellement d'un support en matière plastique, de type polymère, par exemple des billes de latex, ou de billes magnétiques. Il est entendu que tout autre matériel synthétique ou biologique peut être utilisé, dès lors qu'il n'induit pas d'altération

substantielle des qualités des exosomes ou des cellules. Avantageusement, on utilise des billes d'un diamètre de 1 à 10 μm , par exemple de 2 à 5 μm . L'immobilisation des exosomes sur les supports est avantageusement obtenue par liaison covalente, par exemple par activation par un aldéhyde, ou tout autre réactif de couplage chimique. D'une manière générale, l'immobilisation des exosomes est réalisée par incubation des exosomes avec le support en solution, dans les conditions permettant la fixation, puis les supports sont récupérés par centrifugation. Les supports fonctionnalisés ainsi obtenus peuvent être utilisés pour caractériser les exosomes ou pour détecter ou amplifier in vitro des lymphocytes T, comme il sera décrit en détails dans la section expérimentale.

D'autres aspects et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs. En outre, toutes les publications citées dans la demande sont incorporées à la présente par référence.

Légendes des figures

Figure.1 . Production de complexes CMH-peptide DR1-HA fonctionnels dans la lignée RBL2H3.

A. Analyse de l'expression de surface par cytométrie de flux des molécules du CMH II humaine DR1 avant (gauche) et après (droite) transfection des ADNc codant pour les chaînes α et β de DR1 dans la lignée RBL 2H3. Les molécules DR1 sont détectées par l'anticorps L243 (trait noir) lui-même révélé par un sérum de chèvre anti-IgG de souris couplé au FITC.

B. Expression de surface de DR1 dans la lignée exprimant une chaîne invariante (IiHA) où le peptide CLIP a été remplacé par le peptide 308-319 issu de l'hémagglutinine du virus de la grippe. Les molécules DR1 sont détectées sur la lignée RBL DR1 IiHA et un lymphocyte B transformé par l'EBV (Hom2) de même haplotype par l'anticorps L243 (trait noir).

C. Stimulation de lymphocytes T spécifiques du complexe DR1 -HA par la lignée RBL exprimant ce complexe ou des B-EBV de même haplotype. Les lignées RBL DR1IiHA et B-EBV Hom2 étaient diluées dans des plaques de culture avec un lymphocyte T spécifique du complexe DR1 HA. La lignée B-EBV Hom2 était aussi incubée en présence de concentration saturante (10 mM) du peptide HA. La production d'IL2 dans les surnageants de culture permet d'évaluer la stimulation des lymphocytes T spécifiques du peptide HA. L'IL2 est mesurée par l'intermédiaire

d'un test d'incorporation de thymidine tritiée de la lignée CTLL2 dont la prolifération est IL2-dépendante.

D. Analyse de la saturation en peptide HA de la lignée RBL DR1 liHA. Les cellules Hom2 et RBL DR1 liHA étaient incubées (100 cellules par puits) en présence de concentrations croissantes du peptide HA et des lymphocytes THA. La stimulation des lymphocytes a été évaluée comme précédemment.

Figure 2 : Accumulation des molécules DRI dans un compartiment de sécrétion de RBL2H3.

A. Analyse du site intracellulaire d'accumulation des molécules DR1 dans RBL 2H3. Les cellules RBL DRLHA ont été fixées avec 0,5% glutaraldéhyde puis perméabilisées avec 0,05% Saponine. Les molécules DR1 et la chaîne invariante ont été détectées respectivement avec les anticorps L243 et PIN1 puis un sérum d'âne anti-IgG de souris couplé au FITC. La sérotonine a été détectée grâce à un sérum de lapin spécifique révélé avec un sérum d'âne anti-IgG de lapin couplé au Texas red. Les images ont été obtenues par microscopie confocale (Leica). L'épaisseur des plans de coupe étaient de 0,5 micron.

B. Purification des exosomes de RBL DR1liHA. Après lavage dans du DMEM, les cellules ont été incubées pendant 30 minutes en présence de 1 mM de ionomycine à 37°C. Les exosomes ont été purifiés par ultracentrifugation différentielle à partir du surnageant des cellules. Le culot d'exosomes, remis en suspension dans du PBS, a été séparé (5 mg) par SDS-PAGE puis transféré sur une membrane de Nylon. La chaîne β de DR1 a été détectée avec l'anticorps monoclonal IB5 dans la préparation d'exosome et en contrôle dans les lysats des cellules RBLDRLHA et Hom2 (équivalent de 10^5 cellules par puits) migrés dans les mêmes conditions.

Figure 3 : Utilisation des exosomes pour la production d'anticorps antiDRI HA

A. Des dilutions croissantes des sérums des souris immunisées avec les exosomes ont été incubées avec les cellules RBL exprimant (droite) ou non (gauche) les molécules DR1 HA. Le marquage, ainsi obtenu, a été analysé par cytométrie de flux.

B. Les sérums des rats (dilués au 1 / 1 00) immunisés avec les exosomes ont été incubés avec les cellules RBL exprimant ou non (gauche) les molécules DR1 HA. A droite, les cellules exprimant DR1 ont été préalablement incubées ou non pendant deux heures à 37°C avec 10 mM du peptide HA puis avec la même dilution du sérum des rats immuns.

C. La rate du rat immun a été fusionnée avec la lignée X63A8 dans des conditions classiques de fabrication d'anticorps monoclonaux. Le surnageant des différents hybridomes a été testé par immunofluorescence sur les cellules RBL2H3 exprimant ou non les molécules DR1 ou DR1 HA. Les clones a4O, b82 et a15 sont des exemples représentatifs des anticorps obtenus.

Figure 4 -. Utilisation des exosomes pour la détection des lymphocytes T spécifiques du complexe DR1 HA

A. Les cellules RBL DR1 liHA ont été incubées en présence de 5mM de « Green Tracker » (lipide fluorescent s'accumulant dans les compartiments lysosomaux des cellules) pendant 30 minutes à 37°C puis lavées et réincubées pendant une heure à 37°C en absence de marqueur fluorescent. Les cellules ont été fixées (3% paraformaldéhyde), puis analysées par microscopie confocale.

B. En parallèle, les exosomes DR1 HA ont été purifiés à partir des cellules décrites en A. La fluorescence présente dans les échantillons a été quantifiée à l'aide d'un fluorimètre et visualisée directement par microscopie confocale.

C.D. Les exosomes fluorescents DR1 HA ont été incubés à 50mg/ml avec des lymphocytes THA spécifiques du complexe DR1 HA ou des lymphocytes TH30 spécifiques d'un autre complexe (D) pendant deux heures à 37°C en présence d'azide pour bloquer l'internalisation. La fluorescence des cellules a été évaluée par cytométrie de flux.

Figure 5 : Production d'exosomes portant des molécules de classe II du CMH

A L'expression de molécules de classe II IAb est détectée par l'anticorps monoclonal Y3P et analysée par cytométrie de flux. Les transfectants obtenus dans la cellule RBL2H3 expriment des niveaux similaires de molécules de classe II reconnues par Y3P qu'un lymphome B contrôle B414.

B Analyse par western blot de l'expression de la molécule IAb dans RBL. 10 mg d'un lysat cellulaire et d'une préparation d'exosomes provenant de la cellule RBL IAbli ont été analysés par western blot avec un sérum de lapin spécifique de la région cytoplasmique de la chaîne α de la molécule IA.

C Analyse par cytométrie de flux de la composition des exosomes. Des billes de latex ont été recouvertes soit de sérum de veau foetal (FCS) soit d'exosomes provenant de la cellule RBL 2H3 (exos RBL) soit de transfectant de cette cellule avec les molécules de classe II murines IAbli (Exos IAbli) ou humaine DR1liHA (exos DR1liHA). La

molécule CD63 du rat est détectée avec l'anticorps AD1, les molécules IAb avec l'anticorps Y3P tandis que les molécules DR1 sont détectées par l'anticorps L243. Ces différents anticorps sont révélés par des anticorps secondaires couplés à la phycoérythrine.

5

Figure 6 : Caractérisation morphologique des exosomes produit par RBL-2H3:

A Les cellules RBL-2H3 transfectées avec HLA-DR1 ont été fixées avec de la paraformaldéhyde. Des coupes congelées ultrafines ont été préparées et immunomarquées avec des anticorps polyclonaux dirigés contre les molécules HLA-DR. Ces anticorps sont visualisés avec de la protéine A couplée à des particules d'or colloïdal de 10 nm. Les molécules de classe II sont détectées essentiellement dans des compartiments remplis de membranes d'aspect vésiculaire. Barre : 250 nm.

B C. Caractérisation morphologique des exosomes sécrétés par les cellules RBL-2H3 Les exosomes sont fixés avec de la paraformaldéhyde 2% dans du tampon phosphate 0.2M pH 7.4. (tampon PB) et déposés sur des grilles de microscopie électronique recouvertes d'un film de formvar carboné. Les exosomes sont soit contrastés et enrobés dans une solution d'acétate d'uranyle 4% et du méthylcellulose (b) soit immunomarqués avec des anticorps dirigés contre les molécules de classe II avant l'enrobage (c). Comme dans la figure (a), les anticorps sont visualisés avec de la protéine A couplée à des particules d'or colloïdal de 10 nm. Barres : 250 nm.

20

Figure 7 : Manipulation de la composition interne des exosomes, introduction d'une protéine recombinante.

A L'expression de molécules de classe II DR1 est détectée par l'anticorps monoclonal L243 et analysée par cytométrie de flux. La transfection de molécules dans la cellule RBL2H3 induit l'expression de niveaux similaires de classe II reconnu par Y3P qu'un lymphome B contrôle B414.

B Analyse par western blot de l'expression de la molécule DR1 GFP dans RBL. 10 µg d'un lysat cellulaire et 20 µg d'une préparation d'exosomes provenant de la cellule RBL DR1 GFP ont été analysés par western blot un couple d'anticorps monoclonaux spécifique de la GFP.

30

C Analyse par cytométrie de flux de la composition des exosomes. Des billes de latex ont été recouvertes soit de sérum de veau foetal (FCS) soit d'exosomes provenant de la cellules RBL DR1GFP. Les molécules DR1 sont détectées par l'anticorps L243 et des

anticorps secondaires couplés à la phycoerythrine tandis que la présence la GFP est détectée directement dans le canal FL1.

Figure 8

5 A Liaisons d'exosomes fluorescents par des cellules T spécifiques. Des exosomes produits à partir de cellules RBL DR1 liHA marquées au green cell tracker ont été incubés en présence de deux types de cellules T: des THA qui possèdent un TCR spécifique des complexes HLA-DR1/HA et des T Jurkat sauvages dépourvues d'un tel récepteur. Les exosomes fluorescents ont été incubés pendant 3 heures à 37°C avec les
10 deux lignées de lymphocytes T puis le marquage résultant était analysé au FACS.

B Acquisition d'un marqueur d'exosomes par les cellules T spécifiquement marquées. Les mêmes de marquages qu'en A ont été réalisés mais la liaison des exosomes (non marqué au green cell tracker) aux cellules T était détectée avec un anticorps monoclonal de souris AD1 anti CD63 de rat, révélé ensuite par des anticorps d'âne anti
15 IgG de souris marqués à la phycoérythrine (Jackson Immuno Research, West Grove, PA). Le même marquage a été réalisé en parallèle sur les cellules T n'ayant pas été exposées à des exosomes.

C Stimulation des Lymphocytes par des exosomes. Les exosomes purifiés à partir des cellules DR1GFP ont été crosslinkés sur des billes de latex préparées de la même
20 façon que pour la cytofluorométrie de flux mais lavées en milieu complet. Chaque culot de billes a été repris dans 100 µL, 50µL déposé dans le premier puits d'une plaque 96 puits et 50µL dilué de deux en deux. Les cellules T (T Jurkat et THA1.7) ont été ajustées à 106 cellules/mL et 50µL ont été déposés par puits en présence ou en absence du peptide HA307-319 à 5µM. La plaque de culture a été placée dans l'incubateur (37°C, 5% CO₂,
25 H₂O) pendant 20 heures puis le surnageant a été prélevé et la concentration d'IL2 a été évaluée par un test CTL.L2.

Figure 9 : Caractérisation des cellules et des exosomes HMC-1

A analyse des cellules HMC-1 par cytofluorométrie de flux, trait plein foncé
30 :cellules seules; trait plein clair : anticorps anti-souris-FITC seul; pointillés serrés : anticorps spécifique + anti-souris-FITC.

B analyse des exosomes HMC-1 collés sur des billes de latex par cytofluorométrie de flux, trait plein foncé : billes latex-exosomes HMC-1 seules; trait plein clair : anticorps anti-souris-FITC seul; pointillés serrés : billes témoins latex-SVF + anticorps spécifique

+ anti-souris-FITC; pointillés lâches : billes latex-exosomes + anticorps spécifique + anti-souris-FITC

C analyse par Western-blot d'un lysat de cellules HMC-1 comparé à leurs exosomes; 10 ou 3 µg de protéines par put; HC10: surnageant au 1/10e ; 1B5: surnageant au 1/10e ; CD63: 5 µg/mL; Lamp1: 2 µg/mL; H68.4: surnageant au 1/10e. Les exosomes semblent enrichis en CD63, Lamp1, TfR. L'absence de CMH de classe II tant dans le lysat que dans les exosomes confirme l'analyse par cytofluorométrie. La proportion de CMH de classe I semble identique pour le lysat cellulaire et les exosomes.

10 Matériels et Méthodes

Cellules

Les cellules utilisées pour la production d'exosomes dans la partie expérimentale sont des cellules de mastocytes murins ou humains. Plus particulièrement, une lignée tumorale de basophiles au phénotype de mastocytes muqueux, désignée RBL-2H3, a été utilisée (Barsumian et al, Eur. J. Immunol. (1981) 317), ainsi qu'une lignée de mastocytes immatures humains (HMC-1). D'autres cellules de mastocytes, en particulier établies en lignée, peuvent être utilisées, telles que des lignées dérivées des cellules RBL (Rat Basophilic Leukemia), déposées à l'ATCC sous le numéro CRL1378 (Kulczycki et al., J. Exp. Med. 139 (1974) 600).

Des lignées lymphocytaires T capables de reconnaître un antigène particulier dans un contexte CMH II humain (DR1) ont également été utilisées. En particulier, la lignée Jurkatt transfectée avec l'ADNc codant le récepteur des cellules T ("T-HA") spécifique du peptide 306-318 de l'Hémagglutinine du virus de l'influenza en association avec HLA-DRI (Sidhu et al., J. Exp. Med. 176 (1992) 875). La lignée de cellules B humaines transformées par le virus d'Epstein Barr (lignée Hom-2) a été utilisée comme contrôle pour la réponse restreinte à HLA-DR1.

Les cellules ont été cultivées en milieu DMEM (Gibco BRL), RPMI, ou "CLICK" : milieu RPMI supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (Sigma), 1 mg/ml de pénicilline-streptomycine, 1 mg/ml de glutamine, 5 mM de pyruvate de sodium et 50 µM de b-mercaptoéthanol. Tout autre milieu adapté à la culture de cellules eucaryotes, notamment mammifères, peut bien entendu être utilisé.

Les cellules ont été principalement cultivées en flacon de culture de 25 ou 15 cm³. Les cellules RBL-2H3 étant des cellules adhérentes, elles sont décollées du support grâce à l'action de la Trypsine-EDTA (Seromed). Afin de produire ces dernières en

grandes quantités, il est également possible de les cultiver en "spinner", à la densité de 10^6 cellules/ml.

Plasmides

5 Pour modifier génétiquement les cellules de mastocytes, les constructions génétiques suivantes ont été réalisées.

Les ADNc codant pour la chaîne HLA-DR1 α humaine (Larhammer et al., Ceil 30 (1982) 153), la chaîne HLA-DR1 β humaine (Bell et al., PNAS 82 (1985) 3405) et la chaîne invariante humaine p33 li (Ciaesson et al., PNAS 80 (1983) 7395) ont été isolés.

10 L'ADNc codant pour la chaîne invariante p33li a ensuite été modifié par PCR pour remplacer la région codant pour le peptide CLIP (résidus 87-102) par un site de restriction. Cet ADNc permet ainsi d'insérer, en lieu et place du peptide CLIP, tout fragment d'ADNc d'intérêt codant pour un peptide antigénique (Stumptner et al., EMBO J. 16 (1997) 5807). Dans un exemple précis, un fragment d'ADN codant pour le peptide
15 HA308-319 de l'hémagglutinine du virus de la grippe a été inséré dans cet ADNc, codant pour un polypeptide chimère li(HA308-319).

Les acides nucléiques décrits ci-dessus ont ensuite été clonés, séparément, dans le plasmide pSR α sous le contrôle du promoteur SR α (Takebe et al., Mol. Cell Bio. 8 (1988) 466). Chacun des plasmides a ensuite été modifié de manière à incorporer un
20 gène de résistance différent, permettant une sélection pour chacun des plasmides, et donc pour chacune des chaînes ; la chaîne α avec le gène de résistance à la néomycine ; la chaîne β avec le gène de résistance à l'hygromycine, et la chaîne invariante avec le gène de résistance à la zéocine.

Transfections

25 Pour introduire les différents acides nucléiques dans les cellules de mastocytes, les vecteurs plasmidiques correspondants ont été linéarisés par l'enzyme de restriction ScaI. 50 μ g de chaque plasmide ont été linéarisés puis précipités à l'éthanol, et les culots ont été resuspendus en présence de cellules RBL-2H3 à une concentration de 1.10^7
30 cellules/ml. Des transformants stables ont été obtenus par électroporation de 5.10^6 cellules au moyen d'un « gene pulser » (Bio-Rad, Richmond, CA) dans les conditions suivantes : 260V, 960 μ F. 72 heures après l'électroporation, les transfectants sont sélectionnés par culture en milieu de sélection comprenant 250 μ g/ml de G418 (Généticine, Gibco) 1mg/ml d'hygromycine et 500 μ g/ml de zéocine. Après 8 jours de
35 culture en milieu de sélection, 60 à 90% des cellules présentes sont transfectées. Les

transfectants ont ensuite été ensemencés sur boîte de petri en milieu de sélection à une concentration permettant l'apparition de colonies adhérentes individualisées. Les clones ainsi obtenus ont été prélevés et mis en culture séparément. Ces clones peuvent être conservés sous forme congelée, en vue d'une utilisation ultérieure.

5

Anticorps

Y3P (MHC II (IA)) est un anticorps monoclonal de souris reconnaissant le complexe IAb $\alpha\beta$ (Janeway et al., 1984). L'anti IA α est un sérum de lapin dirigé contre la partie cytoplasmique de la chaîne α de IA. L'anti-GFP est un mélange de deux anticorps
10 monoclonaux (clones 7.1 and 13.1) dirigé contre la "green fluorescent protein" vendu par Boehringer Mannheim. Dans les expériences de cytofluorométrie de flux, les seconds anticorps utilisés sont des fragments F(ab')₂ couplés à la (-Phycoérythrine, produits chez l'âne et dirigés contre les IgG (H+L) de souris (Jackson Immunoresearch Laboratories).

15

Billes

Les billes latex : Surfactant-free white aldehyde/sulfate latex, D : 3,9 μ m, Interfacial Dynamics Corp., Portland, Or. USA

Microscopie électronique

20

Les cellules RBL-2H3 transfectées avec HLA-DR1 ont été fixées avec de la paraformaldéhyde 2% dans du tampon phosphate 0.2M pH 7.4. (tampon PB) Après fixation les cellules ont été lavées avec du tampon PB -glycine 50mM puis enrobées dans de la gélatine 10%. Après solidification des blocs ont été préparés, infusés dans le sucrose 2.3M et congelés dans l'azote liquide. Des coupes congelée ultrafines ont été
25 préparées et immunomarquées avec des anticorps polyclonaux dirigés contre les molécules HLA-DR. Ces anticorps sont visualisés avec de la protéine A couplée à des particules d'or colloïdal de 10 nm.

30

Les exosomes sont fixées avec de la paraformaldéhyde 2% dans du tampon phosphate 0.2M pH 7.4. (tampon PB) et déposés sur des grilles de microscopie électronique recouvertes d'un film de formvar carboné.

Les exosomes sont soit contrastés et enrobés dans une solution d'acétate d'uranyle 4% et du méthylcellulose soit immunomarqués avec des anticorps dirigés contre les molécules de classe II avant l'enrobage. Les anticorps sont visualisés avec de la protéine A couplée à des particules d'or colloïdal de 10 nm.

35

Résultats

1 -Production d'exosomes DR1 HA

1.1. Construction et caractérisation de cellules productrices génétiquement modifiées

Afin de produire, de manière contrôlée, des exosomes portant des complexes CMH-peptide de composition définie, les chaînes a et b des molécules de classe II du CMH, DR1, ont été exprimées dans la lignée lo mastocytaire RBL2H3, issue d'une leucémie à basophile du Rat. Pour cela, deux vecteurs portant respectivement un acide nucléique codant pour chaque chaîne, sous contrôle du promoteur SRa ont été transfectés simultanément dans les cellules (voir matériels et méthodes). Les résultats obtenus par cytométrie de flux montrent que les cellules transfectées expriment bien les molécules DR1 (Figure 1A).

Ces cellules RBL-2H3 DR1 ont ensuite été sensibilisées à un peptide donné, de composition précise, afin de générer des complexes CMH-peptide de composition définie. Pour cela, différentes techniques peuvent être envisagées. Dans un mode de réalisation simple, le peptide peut être incubé directement avec les exosomes. Dans une autre variante, un acide nucléique codant pour le peptide peut être introduit dans les cellules, de manière à exprimer également ce peptide. Dans cet exemple particulier de mise en oeuvre, pour fabriquer une cellule présentatrice comportant une seule spécificité antigénique, le peptide antigénique choisi a été introduit dans les cellules sous forme d'une fusion génétique avec la chaîne invariante humaine Ii. Plus particulièrement, le peptide CLIP de la chaîne invariante a été remplacé par la séquence du peptide choisi, issu de l'hémagglutinine (HA 308-319) du virus de la grippe, connu pour se lier avec la molécule DR1. Cette construction (IiHA) a été transfectée dans les cellules dans les conditions décrites dans les Matériels et Méthodes. La chaîne hybride exprimée dans les cellules RBL-2H3 DR1, a permis construire des cellules qui expriment des molécules DR1 reconnues par l'anticorps L243 à un niveau similaire qu'une lignée B-EBV (Hom2) contrôle d'haplotype DR1 (Figure 1B). Ces résultats montrent donc que les cellules de mastocytes de l'invention expriment bien un complexe peptide-CMH humain fonctionnel, de composition prédéterminée et contrôlée.

Le caractère fonctionnel des complexes peptide-CMH exprimé par les cellules de l'invention a été confirmé dans un test de stimulation de lymphocytes T spécifiques de la

combinaison DR1-HA portée par les cellules. Pour cela, les cellules de l'invention ont été incubées en présence de lymphocytes THA, et la stimulation a été déterminée par mesure de l'interleukine-2 libérée dans le surnageant, par un test de croissance d'une lignée cellulaire IL-2-dépendante. Comme contrôle, une lignée de lymphocytes B transformée par l'EBV (Hom-2), d'haplotype DR1, pulsée par une concentration saturante (10mM) du peptide HA a été utilisée.

Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 1 C et 1 D. Ils montrent que les cellules de mastocyte de l'invention expriment un complexe DR1-HA, capable de stimuler un lymphocyte T spécifique de cette combinaison. Ils montrent également que la stimulation obtenue en présence des cellules de l'invention est plus efficace que celle produite par les cellules contrôle (B-EBV d'haplotype DR1) pulsées par une concentration saturante (10mM) du peptide HA. Enfin, les résultats obtenus montrent que les molécules DR1 semblent ne présenter que le peptide HA puisque l'addition d'une concentration saturante de peptide n'augmente pas de manière significative la capacité des cellules RBL DR1 liHA à stimuler un lymphocyte T HA (Figure 1 D).

L'ensemble de ces résultats démontre donc le caractère fonctionnel des complexes peptide-CMH produits. Ils illustrent également le caractère spécifique des cellules obtenues, et donc le caractère spécifique du procédé de l'invention qui permet d'obtenir des cellules (et des exosomes) portant des molécules de composition définie et contrôlée.

1.2. Production des exosomes fonctionnalisés

Une étude par immunofluorescence a permis de montrer que les complexes recombinants CMH-peptide (DR1 HA) s'accumulent dans les granules de sécrétion de la lignée cellulaire RBL-2H3. La Figure 2A témoigne en effet de la colocalisation des molécules DR1 avec la sérotonine dans des structures intracellulaires vésiculaires.

La possibilité que des exosomes fonctionnels puissent être relargués par ces cellules a donc été étudiée. Pour cela, les cellules ont été cultivées en présence d'un ionophore calcique, et la production de vésicules membranaire a été suivie. Plus particulièrement, les cellules ont été centrifugées à 300 g pendant 5 minutes à température ambiante. Sur chaque culot cellulaire, une solution de ionophore calcique (Ionomycine 1 mM) a été ajoutée (environ 300 µl) et l'incubation a été poursuivie pendant 30 minutes à 37°C. L'exocytose a été stoppée par refroidissement rapide dans la glace et ajout de 300 µl d'une solution froide PBS-EGTA 1 mM. Les cellules ont ensuite été centrifugées à 300g

à 4°C pendant 5 minutes. Les surnageants ont été récupérés et recentrifugés, tout d'abord 5 minutes à 1200 g, puis 5 minutes à 10 000 g, puis enfin 1 heure à 70 000 g. Après cette centrifugation différentielle, les culots (comprenant les exosomes) sont repris et solubilisés dans une solution tampon (30 µl de tampon de Laemmli-DDT (IX ou 2X)). Une fraction des culots est également solubilisée dans un tampon de lyse pour déterminer la concentration protéique. Les solutions d'exosomes peuvent être séparées par migration sur gel (mini-gel 12% de polyacrylamide) à 20 mA puis transférées sur Immobilon. L'analyse des exosomes est ensuite réalisée par western blotting avec des anticorps spécifiques des différentes chaînes des molécules de classe II du CMH.

Les résultats obtenus montrent que des exosomes peuvent être relargués de la lignée RBL-2H3, de manière importante, après stimulation par un agent approprié. Ces exosomes peuvent être isolés et purifiés par exemple par ultracentrifugation différentielle pour la préparation de composition d'exosomes. Enfin, les résultats présentés sur la Figure 2B démontrent que ces exosomes sont fonctionnels. En effet, les analyses par western blotting montrent que les exosomes obtenus expriment les différentes chaînes recombinantes des molécules de classe II du CMH. En outre, ces résultats montrent également la forte densité des complexes peptide-CMH à la surface des exosomes de l'invention.

Les exemples qui suivent illustrent notamment l'utilisation des exosomes DR1 HA pour la production d'anticorps spécifiques de cette combinaison et la capacité des exosomes DR1 HA à lier des lymphocytes T spécifiques de cette même combinaison.

2 - Génération d'anticorps spécifiques du complexe DR1 HA

Cet exemple illustre l'utilisation des exosomes de l'invention pour la production d'anticorps, en particulier d'anticorps dits "restreints", c'est-à-dire spécifiques du peptide antigénique en association avec la molécule du CMH. Cet exemple illustre notamment le pouvoir immunogène très important des exosomes de l'invention, puisqu'ils permettent la production d'anticorps en l'absence de tout adjuvant.

Les exosomes purifiés à partir du surnageant des cellules RBL DR1 HA (exemple 1) ont été remis en suspension dans du PBS. Ces exosomes ont ensuite été utilisés pour immuniser des souris Balb/c ou des rats LOU en absence de tout adjuvant, selon les protocoles suivants :

- Les souris ont été injectées par voie sous cutanée avec 10µg d'exosomes, deux fois à trois semaines d'intervalle, puis 30µg par voie intrapéritonéale et enfin 30 µg par voie intraveineuse 3 jours avant le prélèvement des sérums.

- Les rats ont été injectés avec des exosomes par voie intrapéritonéale (10µg), par deux reprises à trois semaines d'intervalle, puis par voie intraveineuse (50µg) trois jours avant le prélèvement des sérums.

Comme le montre la Figure 3A, les sérums prélevés chez les souris immunisées présentaient une très forte réactivité contre la lignée RBL exprimant ou non le complexe DR1 HA mais qui était détectable jusqu'à une dilution au trente millième des sérums seulement dans le cas de la cellule DR1 HA.

Comme le montre la Figure 3B, les sérums des rats ainsi immunisés, montraient, de manière surprenante, une réactivité contre la lignée RBL exprimant le complexe DR1 HA alors que les mêmes sérums réagissaient avec une plus faible intensité avec la lignée initiale RBL-2H3. En outre, l'addition du peptide HA à des cellules exprimant DR1 (RBL-2H3 DR1) augmente de manière significative la réactivité des antisérums ainsi produits (Figure 3B).

Ces résultats montrent donc que les exosomes de la lignée RBL sont capables d'induire une réponse anticorps qui, de manière inattendue, est principalement dirigée chez le rat contre les complexes DR1 HA.

Les rates des rats immuns ont été fusionnées avec des cellules de la lignée X63A8. Les hybridomes ainsi obtenus ont été triés par dilution clonale, selon les techniques classiques d'immunologie, puis sélectionnés par immunofluorescence pour la spécificité des anticorps monoclonaux produits. Différents anticorps monoclonaux ont ainsi été obtenus, pour certains dirigés contre des protéines de la lignée RBL, pour d'autres, contre des déterminants monomorphiques des molécules de classe II humaine d'haplotype DR1 et enfin contre le complexe constitué par les molécules DR1 associées au peptide issu de la protéine HA du virus de la grippe (Figure 3C). Ces derniers anticorps monoclonaux constituent des anticorps restreints, et possèdent donc des propriétés particulièrement avantageuses pour des applications diagnostiques ou thérapeutiques.

3 - Détection de lymphocytes T spécifiques du complexe DR1 HA

Cet exemple illustre l'utilisation des exosomes de l'invention pour la détection de lymphocytes T spécifiques dans un échantillon biologique. Cet exemple montre

également comment les exosomes peuvent être utilisés pour sélectionner et amplifier une population de lymphocytes T particuliers, en vue notamment de leur réinjection à un sujet (thérapie cellulaire). Cette approche peut bien entendu être étendue à l'utilisation des anticorps restreints décrits dans l'exemple 2, ainsi qu'à la détection de tout récepteur spécifique d'un ligand.

Pour la mise en oeuvre de cette application, des exosomes marqués ont été produits. Pour cela, avant purification des exosomes de la lignée DRI HA, celle-ci a été incubée avec un traceur fluorescent s'accumulant très fortement dans les exosomes contenus dans les granules de sécrétion. Le marqueur utilisé, 'Green Tracker', est un lipide fluorescent qui s'accumule dans les lysosomes des cellules. L'analyse en microscopie confocale des cellules, après fixation, montre la présence du marquage fluorescent dans les granules de sécrétion des cellules (Figure 4A). Les exosomes fluorescents ont ensuite été produits et purifiés à partir de ces cellules, dans les conditions décrites dans l'exemple 1. Rendus ainsi fluorescents, ces exosomes (Figure 4B) ont été utilisés pour détecter, dans un échantillon biologique, la présence de lymphocytes T spécifiques de la combinaison DRI HA (lymphocytes THA). Il est entendu que tout autre marquage peut être utilisé dans le cadre de l'invention, appliqué soit sur les cellules productrices, soit sur les exosomes produits.

Pour cela, les exosomes ont été incubés en présence d'un échantillon de lymphocytes THA et de lymphocytes TH30, spécifiques d'un autre complexe. Les résultats obtenus par cytofluorométrie de flux montrent que les exosomes exprimant les DRLHA se lient, de manière spécifique, aux lymphocytes THA (Figure 4C) alors que ces mêmes exosomes sont incapables de reconnaître des lymphocytes possédant une autre spécificité (Figure 4D). Ces résultats démontrent la capacité unique et inattendue des exosomes produits par la lignée mastocytaire selon l'invention de détecter des lymphocytes T spécifiques de ce même complexe. Cette application peut être mise en oeuvre à partir de tout type d'échantillon biologique.

En outre, cette technologie peut être appliquée de la même façon à la fabrication et à l'utilisation d'exosomes exprimant des complexes CMH-peptide. La présente invention permet ainsi de détecter, à la surface de cellules présentatrices, voire de cellules tumorales, la présentation, par les molécules de classe I et de classe II du CMH, de peptides issus d'antigènes exprimés par les tumeurs. La présente invention permet également de détecter voire de purifier les lymphocytes T capables de reconnaître ces mêmes complexes. Ils peuvent ainsi permettre d'amplifier une population de lymphocytes T spécifiques d'un complexe peptide-CMH particulier, par exemple une

population de lymphocytes CTL, en vue de leur utilisation thérapeutique. En effet, différentes approches d'immunothérapies de cancers ou d'infections virales, par exemple, ont été développées, basées sur le prélèvement, chez un sujet, de lymphocytes et sur l'expansion ex vivo de clones particuliers de lymphocytes T spécifiques d'un antigène impliqué dans la pathologie (antigène tumoral ou viral, par exemple). Ces clones amplifiés sont ensuite réadministrés au sujet, comme agent thérapeutique. La présente invention permet de faciliter grandement la sélection et l'amplification des clones spécifiques de lymphocytes T, et donc le potentiel et la mise en oeuvre de ces approches thérapeutiques.

4- Production d'exosomes portant des molécules de classe II du CMH murines (Figures 5A, 5B).

Les ADN complémentaires codant les chaînes α et β des molécules de classe II murine d'haplotype IAb ainsi que la chaîne invariante murine ont été introduits dans les vecteurs d'expression eucaryotes NT dans lesquels la transcription de l'ADNc est sous le contrôle d'un promoteur SR alpha. Chacun des plasmides, en outre, porte un gène de résistance à l'hygromycine (pour la chaîne α IAb), à la néomycine (pour IAb β chaîne), ou à la zéocine (pour la chaîne invariante). Après transfection des cellules RBL2H3 par électroporation (matériels et méthodes), les cellules ont été sélectionnées sur la base de leur résistance aux trois antibiotiques puis, les cellules résistantes ont été clonées par dilution limite et caractérisées pour l'expression des molécules IAb par cytométrie de flux en utilisant l'anticorps spécifique Y3P.

La figure 5 montre quelques uns des résultats ainsi obtenus. L'analyse par cytométrie de flux montre que la cellule RBL IAbli est reconnue par l'anticorps Y3P (spécifique des molécules IAb) de manière équivalente à la lignée lymphocytaire B B4 14, alors qu'aucun marquage n'est détectable sur la lignée RBL d'origine (Figure 5A). L'analyse morphologique par microscopie ayant établi que les molécules de classe II IAb murines sont, comme les molécules humaines DR1, accumulées dans les granules de sécrétion de la cellule (non montré), ceci nous a amené à rechercher leur localisation dans les exosomes. L'exocytose des cellules étant déclenchée par l'addition de 1mM de ionomycine, les exosomes ainsi obtenus ont été purifiés par ultracentrifugation différentielle (Cf exemple 1.2). L'analyse par western blot de ces préparations d'exosomes montre qu'elles contiennent des molécules murines de classe II du CMH identiques à celles détectées dans un lysat cellulaire contrôle (Figure 5B).

Ces résultats établissent que des molécules de classe II humaines (DR1) mais aussi murines (IAb) peuvent être exprimées et s'accumuler dans les exosomes des lignées RBL 2H3 correspondantes.

5 5- Caractérisation morphologique des exosomes produits par RBL 2H3 (Figure 6)

Les observations en microscopie électronique sur coupe congelée immunomarkée des cellules RBL révèlent la présence de nombreux compartiments intracellulaires remplis de membranes. La majeure partie de ces membranes correspondent à des vésicules qui remplissent le lumen des compartiments (Figure 6A). Les molécules de classe II une fois transfectées dans ces cellules s'accumulent dans les compartiments possédant des vésicules internes et sont visualisées en particulier, en association avec la membrane de ces vésicules (Figure 6A).

Lorsque les cellules RBL sont stimulées de façon à induire leur dégranulation (IgE-Antigène ou ionomycine), les compartiments intracellulaires fusionnent avec la membrane plasmique. Les vésicules internes auxquelles sont associées les molécules de classe II sont relarguées dans le milieu extracellulaire. Ces vésicules sont alors appelées exosomes.

La méthode de choix en microscopie électronique pour étudier la morphologie des exosomes ainsi que leur contenu protéique est la méthode de " whole mount ". Cette technique permet de visualiser des exosomes entiers dépourvus de tout autre contenu cellulaire. Cette méthode permet également de détecter ,avec une grande efficacité, des molécules associées à la membrane des exosomes. En utilisant cette technique nous avons observé que les exosomes sécrétés par les cellules RBL ont une taille hétérogène de 30 à 120 nm et une densité aux électrons variable (Figure 6B). Les molécules de classe II sont abondantes dans la population de vésicules possédant une taille de 80 à 100 nm ayant une densité moyenne aux électrons. La grande majorité de ces vésicules enrichies en molécules de classe II ont une forme en assiette (Figure 6C).

30 6- Immobilisation des exosomes sur des supports (Figure 5C).

Cet exemple décrit la fixation d'exosomes sur des supports solides, et montre que les exosomes ainsi fixés conservent leurs propriétés fonctionnelles. Ces nouveaux produits (supports-exosomes) peuvent être utilisés pour caractériser et analyser les

exosomes ; ou comme produits diagnostique ou réactifs pour détecter et/ou stimuler in vitro des lymphocytes T, par exemple.

Différentes préparations d'exosomes produits par des cellules RBL exprimant ou non des molécules de classe II humaines ou murines ont été incubées avec des billes de latex de 4 microns activées par de l'aldéhyde sulfate. Plus particulièrement, les exosomes, purifiés à partir de surnageants de dégranulation de RBL 2H3 ont été lavés en PBS (centrifugation à 50000rpm sur TLA 100.4 pendant 30 minutes). 30µg d'exosomes sont mélangés avec 10 µL de billes Latex prélevées stérilement, homogénéisés puis incubés pendant 10 min à 15 min à température ambiante. Le volume de bille est ensuite complété à 1 mL avec du PBS 1x puis incubé sur roue à température ambiante pendant 2h. Ensuite les billes " crosslinkés " avec des exosomes sont:

- Saturées en ajoutant de la glycine 100 mM final (30 min à température ambiante),

- Centrifugées à 2200xg pendant 2 min à 4°C puis le culot de billes est repris dans 1 mL de PBS1x SVF3% NaN3 0,01%

Pour utiliser les billes en cytofluorométrie,

- Laver deux à trois fois le culot de billes en PBS1x SVF3% NaN3 0,01%.

- Reprendre dans 1 mL de PBS 1x NaN3 0,01% .

- Utiliser entre 5µL et 20µL par point et incubé classiquement dans le premier puis le second anticorps. La lecture se fait sur Facscalibur (Becton Dickinson).

Cette technique a permis de recouvrir la surface de ces billes de latex avec des exosomes, tout en préservant leur structure.

Lorsque les exosomes sont sur les billes, leur manipulation est plus aisée. En effet, ils peuvent être centrifugés à basse vitesse et détectés par des techniques de cytométrie de flux classique. La figure 5 C montre quelques exemples de détection, par cytométrie de flux, de différentes protéines entrant dans la composition des exosomes. Des billes de latex activées à l'aldéhyde sulfate ont ainsi été incubées soit avec des exosomes produits par les cellules RBL 2H3 non transfectées, soit avec des exosomes de cellules RBL 2H3 exprimant les molécules de classe II humaines DR1 et la construction IiHA ou les molécules de classe II murine IAb , soit avec du sérum de veau foetal (FCS) en contrôle. Les billes de latex ainsi préparées ont été ensuite incubées avec différents anticorps monoclonaux; AD1 reconnaissant la molécule CD63 du rat présente dans les granules de sécrétion de RBL 2H3, Y3P anticorps spécifique des molécules IAb, et L243 anticorps spécifique des molécules DR1. Ces différents anticorps étaient révélés par des anticorps

secondaires couplés à la phycoerythrine puis les marquages obtenus étaient analysés par cytométrie de flux grâce à un FACScalibur (Beckman).

On observe ainsi que la molécule CD63 est bien-sûr présente sur tous les exosomes issus de la cellule RBL exprimant ou non des molécules de classe II, alors que des billes de latex recouvertes d'exosomes IAb sont spécifiquement reconnues par Y3P et non par L243 tandis qu'à l'opposé, les exosomes DRiHA sont reconnus par L243 et non par Y3P. Aucun de ces anticorps ne reconnaît des billes de latex recouvertes de Sérum de veau foetal (Figure 5C).

Ces résultats montrent que cette technique permet de détecter de manière sensible et spécifique l'expression de différentes protéines rentrant dans la composition des exosomes. L'exemple 8 montre par ailleurs que des tels produits (exosomes-support) permettent également de détecter ou de stimuler la prolifération de lymphocytes T spécifiques.

7-Manipulation de la composition des exosomes (Figure7)

Les exosomes sont des vésicules délimitées par une bicouche lipidique dans laquelle sont insérés un grand nombre de molécules comme les molécules de classe II du CMH ou CD63 citées précédemment. A l'intérieur de ces vésicules, on trouve les régions cytoplasmiques des molécules transmembranaires précédentes mais aussi des protéines solubles issues du cytosol des cellules. Pour démontrer qu'il est possible de modifier à volonté le contenu de ces vésicules, nous avons utilisé comme traceur la Green Fluorescent Protein (GFP).

L'ADNc codant la GFP a été fusionné à l'extrémité COOH terminale de la chaîne beta de la molécule DR1 humaine. Cette construction, insérée dans les vecteurs d'expression NT portant le gène de résistance à l'hygromycine, a été cotransfectée dans la cellule RBL 2H3 avec un vecteur portant la chaîne alpha de DR1 et le gène de résistance à la néomycine. Des cellules résistantes à ces deux antibiotiques ont été sélectionnées puis triées positivement pour l'expression de la GFP.

Plus particulièrement, nous avons réalisé une construction liant la partie cytoplasmique de la chaîne DR β (en C-ter) à l'extrémité N-ter de la GFP. L'ADNc de DR β possède un site PstI en position 565. Un fragment de 200 paires de bases environ du côté 3' de cet ADNc a été amplifié par PCR à partir du vecteur pcDNA3/RSV/DRA au moyen de 2 oligonucléotides incluant le site PstI pour le 5' et le site NcoI pour le 3' qui de plus éliminait le codon stop. Le fragment de PCR obtenu a été digéré par PstI et NcoI et

cloné dans les mêmes sites du vecteur pEGFP N1 (Clontech). Le plasmide résultant, digéré par PstI et XbaI, a permis de libérer un fragment correspondant aux derniers 30 acides aminés de DRa suivi de la GFP. En parallèle, le plasmide pcDNA3/RSV a été digéré par EcoRV/PstI, libérant ainsi un fragment correspondant au reste de la chaîne DRa (du début jusqu'au site PstI). Les deux fragments ont ensuite été assemblés puis clonés dans pcDNA3/CMV entre EcoRV et XbaI.

L'analyse de ces cellules (DR1 GFP) par cytométrie de flux montre que les cellules reconnues par l'anticorps L243, spécifique des molécules DR1, émettent aussi une fluorescence verte détectée dans le canal FL1 alors que des cellules transfectées avec les chaînes alpha et beta de DR1 ne comportant pas de GFP n'émettent aucune fluorescence dans le canal FL1 (Figure 7A).

Afin de montrer que la GFP est réellement contenue dans les exosomes de la cellule RBL 2H3, des exosomes issus des cellules RBL DR1 GFP ont été préparés par ultracentrifugation différentielle puis analysés par western blot (Figure 7B) et cytométrie de flux après " crosslinking " sur des billes de latex (Figure 7C). Un anticorps spécifique de la GFP détecte, par western blot, dans la cellule DR1 GFP et dans ses exosomes une protéine de 65 kDa correspondant au poids moléculaire de la chaîne beta de DR1 fusionnée avec la GFP (Figure 7 B) alors qu'aucun signal n'est détecté dans les lysats cellulaires de la cellule RBL2H3 exprimant ou non la molécule DR1 seule. Par comparaison entre des billes de latex " crosslinkées " avec du sérum de veau foetal ou des exosomes issus de la cellule DR1 GFP, on observe que seules les billes recouvertes d'exosomes induisent une fluorescence dans le canal FL1 (FITC) et sont reconnues par l'anticorps L243, spécifique de DR1, détecté par un anticorps secondaire couplé à la phycoerythrine.

Ces résultats démontrent donc qu'il est possible d'introduire une protéine exogène à l'intérieur des exosomes produits par la cellule RBL 2H3. Ces résultats montrent aussi qu'il est possible de diriger une protéine dans un exosome par expression, dans la cellule productrice, sous forme de fusion avec une molécule transmembranaire, telle qu'une molécule du CMH.

8-Characterisation fonctionnelle des exosomes (Figure 8)

Cet exemple montre que les exosomes produits par la cellule RBL2H3, portant des molécules de classe II du CMH, sont capables de lier un peptide antigénique et de

stimuler un lymphocyte T exprimant un récepteur spécifique de ce complexe peptide-CMH classe II.

Des exosomes produits à partir de cellules RBL DR1 IiHA marquées au green cell tracker ont été incubés en présence de deux types de cellules T : des THA qui possèdent un TCR spécifique des complexes HLA-DR1/HA et des T Jurkat sauvages dépourvues d'un tel récepteur. Les expériences de liaisons sont réalisées en plaque 96 trous à fond rond, en milieu RPMI 1640 complété par 10% de sérum de veau foetal, tamponné par 10mM Hépès à raison de 50µl final par puits, 10⁵ cellules T par puits et des quantités variables d'exosomes fluorescents pendant 3 heures à 37°C. Ensuite, deux lavages sont effectués dans le même milieu avant d'analyser les cellules reprises dans 400 µl de PBS au FACS.

Une gamme effet dose a été réalisée montrant que l'intensité du marquage des THA était proportionnelle à la quantité d'exosomes employée. 10⁸ cellules RBL DR1 IiHA ont donné 700 µl d'exosomes. Des doses allant de 32 à 2 µl d'exosomes par puits ont été testées. Le marquage obtenu avec 16 µl par point a été retenu, ce qui correspond à la production d'exosomes effectuée par 2,3 millions de cellules (résultats non exposés).

Les résultats obtenus montrent que la population THA est marquée par les exosomes fluorescents ce qui donne une fluorescence détectable en FL1 par cytofluorimétrie, tandis que les Jurkats sauvages ne sont pas modifiées (figure 8A).

Le même type de marquage a été réalisé, mais après la liaison des exosomes, les cellules T ont été incubées avec un anticorps monoclonal de souris AD1 anti CD63 de rat, révélé ensuite par des anticorps d'âne anti IgG de souris marqués à la phycoérythrine (Jackson Immuno Research, West Grove, PA). Le même marquage a été réalisé en parallèle sur les cellules T n'ayant pas été exposées à des exosomes. On observe (figure 8B) que seules les cellules THA ayant liés des exosomes comme l'atteste leur fluorescence en FL1, sont aussi marquées en FL2 ce qui indique la nouvelle présence de CD63 de rat à leur surface.

Nos résultats montrent donc que les exosomes fluorescents sont utilisables pour visualiser par cytométrie de flux des populations de lymphocytes T spécifiques de complexes HLA-DR/peptide antigénique portés par les exosomes.

Pour évaluer la capacité des exosomes à stimuler un lymphocyte T de manière dépendante de la présence d'un peptide, les exosomes obtenus à partir de la cellule DR1 GFP ont été crosslinkés sur des billes de latex puis incubés en présence de cellule de la lignée lymphocytaire T Jurkat exprimant ou non un récepteur T spécifique du complexe DR1-peptide HA 307-319.

Les billes de latex ont été préparées de la même façon que pour la cytofluorométrie de flux mais lavées en milieu complet (RPMI, 10% sérum de veau foetal, Penicilline-Streptomycine-Glutamine 1%, β mercaptoethanol 0,1%, Sodium Pyruvate 4%). Pour la stimulation des lymphocytes T, chaque culot de billes a été repris dans 100 μ L, 50 μ L déposé dans le premier puits d'une plaque 96 puits et 50 μ L dilué de deux en deux. Un contrôle a été fait en procédant de la même façon avec des billes incubées dans du sérum de veau foetal. Les cellules T (T Jurkat Pasteur et THA1.7) ont été ajustées à 10^6 cellules/mL et 50 μ L ont été déposés par puits. Le peptide dilué à 15 μ M dans du milieu complet a été ajouté également à raison de 50 μ L par puits. Dans les séries dépourvues de peptide, 50 μ L de milieu complet ont été ajoutés par puits. La plaque de culture a été placée dans l'incubateur (37°C, 5% CO₂, H₂O) pendant 20 heures puis le surnageant a été prélevé et la concentration d'IL2 a été évaluée par un test CTL.L2.

On observe ainsi que l'addition du peptide HA (5mM) induit spécifiquement la stimulation de la cellule T Jurkat exprimant le récepteur du complexe DR1-HA (THA) alors qu'il n'a aucun effet sur le lymphocyte T contrôle (T Jurkat). Par ailleurs, des exosomes sont incapables de stimuler le THA en absence de peptide HA (Figure 8C).

9-Exosomes de la lignée mastocytaire humaine HMC1 (Figure 9)

Cet exemple montre que des exosomes modifiés selon l'invention peuvent être produits à partir d'autres cellules, notamment humaines. En particulier, les résultats que nous avons obtenus démontrent que la lignée mastocytaire d'origine humaine HMC1 est capable de produire des exosomes sous l'impulsion d'une augmentation de calcium intracellulaire et dans des conditions identiques à celles qui induisent la sécrétion d'exosomes par la lignée de rat RBL 2H3.

La caractérisation de la lignée HMC1 par cytométrie de flux indique que la surface de ces cellules exprime des molécules de classe I du CMH (W6.32) mais pas de molécules de classe II (L243). Par ailleurs, elles sont positives pour les molécules CD9, CD63 et CD81 mais négatives pour les molécules Lamp1 et Lamp 2 (Figure 9 A).

Des exosomes ont été produits à partir de la lignée HMC1 par l'addition de Ionomycine (1mM) puis purifiés à partir des surnageants par ultracentrifugation différentielle. Leur composition a été analysée par cytométrie de flux après " crosslinking " sur des billes de latex et par western blot.

L'analyse des exosomes par la méthode utilisant les billes latex montre qu'ils portent les molécules Lamp1, CD9, CD63, CD81 et les molécules de classe I du CMH

mais pas de molécules de classe II ni la molécule Lamp2 (Figure 9B). Par ailleurs, la morphologie observée par microscopie électronique de ces exosomes est identique à ceux produits par la lignée RBL 2H3. Enfin la composition protéique observée par western blot confirme ces résultats puisque nous avons trouvé par cette technique les molécules
5 CD63, Lamp1, CMH de classe I alors que Lamp2, CMH de classe II restent négatifs (Figure 9C).

En conclusion, la lignée HMC1 semble l'homologue humaine de la lignée de rat RBL-2H3 de part sa capacité, après une augmentation de calcium intracellulaire, à produire des exosomes qui ont les mêmes caractéristiques structurales et moléculaires.
10 Ces cellules permettent donc de produire des exosomes humains recombinants exprimant des molécules de classe II du CMH ou toute autre molécule qui y serait spécifiquement adressée.

REVENDICATIONS

1. Vésicule membranaire, caractérisée en ce qu'elle comporte une molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité humain.

5 2. Vésicule selon la revendication 1 caractérisée en ce que la molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité est une molécule de classe II.

3. Vésicule selon la revendication 2 caractérisée en ce que la molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II est une chaîne α .

10 4. Vésicule selon la revendication 2 caractérisée en ce que la molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II comprend une chaîne α et une chaîne β .

5. Vésicule selon l'une des revendications 2 à 4 caractérisée en ce que la molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II est choisie parmi les sérotypes DR1 à DR13, de préférence DR1 à DR7.

15 6. Vésicule selon la revendication 1 caractérisée en ce que la molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité est une molécule de classe I.

7. Vésicule selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisée en ce qu'elle comporte un complexe entre un peptide défini et la molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité.

20 8. Vésicule selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre une ou plusieurs molécules hétérologues d'intérêt.

9. Vésicule selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre un peptide ou une protéine recombinant permettant sa purification.

25 10. Vésicule selon les revendications précédentes caractérisées en ce qu'elle comporte un marqueur.

11. Vésicule selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement dépourvue de molécules du CMH endogène.

30 12. Vésicule membranaire caractérisée en ce qu'elle est obtenue à partir d'une cellule de mastocyte ou dérivée de mastocyte, et en ce qu'elle comporte une ou plusieurs molécules hétérologues d'intérêt.

13. Vésicule selon la revendication 12, caractérisée en ce que la molécule d'intérêt est une protéine, un polypeptide, un peptide, un acide nucléique, un lipide ou une substance de nature chimique, biologique ou synthétique.

35 14. Vésicule membranaire selon la revendication 13, caractérisée en ce que la molécule hétérologue est une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité, un

antigène, un ligand de récepteur, un récepteur de ligand, un acide nucléique, un produit pharmacologique, un marqueur et/ou un peptide de purification.

15. Vésicule selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'elle exprime un récepteur de ligand et en ce qu'elle comporte une autre molécule hétérologue d'intérêt.

5 16. Vésicule membranaire, caractérisée en ce qu'elle comporte une molécule recombinante de fusion entre un polypeptide d'intérêt et un signal d'adressage.

17. Cellule productrice d'exosomes, caractérisée en ce qu'elle comporte un ou plusieurs acides nucléiques recombinants codant pour une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité.

10 18. Cellule selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule de mastocyte.

19. Cellule selon la revendication 18, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une lignée mastocytaire d'une leucémie à basophile, notamment de la lignée RBL, de préférence RBL-2H3.

15 20. Cellule selon l'une des revendications 17 à 19, caractérisée en ce qu'elle comporte un acide nucléique recombinant codant pour une chaîne α et/ou une chaîne β d'une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II et/ou pour une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I.

20 21. Procédé de production d'un exosome comportant une molécule recombinante définie, comprenant les étapes suivantes:

a) la culture d'une cellule de mastocyte ou dérivée de mastocyte comportant un acide nucléique recombinant codant pour ladite molécule recombinante définie,

c) la récupération des exosomes produits par lesdites cellules, ces exosomes comprenant ladite molécule recombinante définie.

25 22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce qu'il comprend une étape intermédiaire b) au cours de laquelle les cellules sont stimulées pour induire et/ou augmenter la sécrétion des exosomes..

30 23. Procédé selon la revendication 21 ou 22 caractérisé en ce que la molécule recombinante définie est exposée à l'extérieur de l'exosome, ou est incluse, en partie ou en totalité, dans la fraction cytosolique de l'exosome.

24. Procédé selon l'une des revendications 21 à 23, caractérisé en ce que la molécule recombinante est une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité, une molécule antigénique, un ligand de récepteur, un récepteur de ligand, un peptide de purification ou tout autre polypeptide d'intérêt.

25. Procédé selon l'une des revendications 21 à 24 caractérisé en ce que l'acide nucléique comprend en outre une région codant pour un signal d'adressage vers les compartiments membranaires du mastocyte.

26. Procédé de préparation d'un exosome comportant un complexe peptide-CMH de composition définie, caractérisé en ce qu'il comprend:

- la culture d'une cellule productrice d'exosomes comprenant un ou plusieurs acides nucléiques recombinants codant pour une molécule recombinante définie du CMH,
- la stimulation des cellules pour induire une libération des exosomes,
- la récupération des exosomes produits par lesdites cellules, ces exosomes exprimant à leur surface ladite molécule recombinante définie du CMH, et,
- la mise en contact des exosomes avec le ou les peptides.

27. Procédé de préparation d'un exosome comportant un complexe peptide-CMH de composition définie, caractérisé en ce qu'il comprend:

- la culture d'une cellule productrice d'exosomes comportant un ou plusieurs acides nucléiques recombinants codant pour une molécule recombinante définie du CMH et un acide nucléique comprenant une région codant pour un peptide recombinant défini,
- la stimulation des cellules pour induire une libération des exosomes,
- la récupération des exosomes produits par lesdites cellules, ces exosomes exprimant à leur surface ladite molécule recombinante définie du CMH associée audit peptide recombinant.

28. Procédé selon la revendication 27, caractérisé en ce que l'acide nucléique codant pour le peptide recombinant code pour un dérivé de la chaîne invariante li, dans lequel la région CLIP a été déléetée et substituée par ledit peptide.

29. Procédé selon l'une des revendications 26 à 28 caractérisé en ce que la cellule productrice est une cellule de mastocyte ou dérivée de mastocyte.

30. Procédé selon l'une des revendications 26 à 29 caractérisé en ce que la cellule productrice est essentiellement dépourvue de molécule du CMH endogène.

31. Procédé de modification de la composition d'un exosome, comprenant

- l'introduction dans une cellule productrice d'exosomes d'un acide nucléique codant pour une molécule définie, liée à un signal d'adressage dans les compartiments membranaires, et,
- la production d'exosomes à partir de ladite cellule.

32. Composition comprenant une ou plusieurs vésicules membranaires selon l'une des revendications 1 à 16.

33. Utilisation d'une vésicule selon l'une des revendications 1 à 16 pour la production d'anticorps, polyclonaux et/ou monoclonaux.

34. Procédé de production d'anticorps, comprenant l'immunisation d'un animal avec une vésicule selon la revendication 7 et la récupération des anticorps et/ou des cellules produisant des anticorps ou impliquées dans la réponse immunitaire.

35. Procédé selon la revendication 34, pour la production d'anticorps monoclonaux, notamment spécifiques de l'association CMH-peptide.

36. Utilisation d'un anticorps obtenu selon la revendication 34 ou 35, ou d'un fragment d'un tel anticorps, pour la détection, dans un échantillon biologique, de la présence d'antigènes spécifiques correspondants.

37. Utilisation d'un anticorps produit selon la revendication 34 ou 35, d'un fragment d'un tel anticorps, ou d'une vésicule selon la revendication 1 pour la préparation d'une composition thérapeutique destinée à inhiber l'interaction entre le récepteur d'un lymphocytes T et le complexe CMH-peptide pour lequel il est spécifique.

38. Utilisation d'une vésicule membranaire selon l'une des revendications 1 à 16 pour la détection de partenaires spécifiques d'une molécule protéique dans un échantillon biologique.

39. Utilisation selon la revendication 38 d'un exosome portant un complexe CMH-peptide pour la détection de lymphocytes T spécifiques de ce complexe dans un échantillon biologique.

40. Utilisation selon la revendication 38 d'un exosome portant un récepteur TcR pour la détection de complexes peptide-CMH spécifiques de ce récepteur dans un échantillon biologique.

41. Utilisation selon la revendication 38 d'un exosome portant un récepteur de ligand pour la détection de la présence dudit ligand dans un échantillon biologique.

42. Méthode pour la détection de la présence de lymphocytes T spécifiques de complexes antigène-CMH dans un échantillon biologique, comprenant la mise en contact dudit échantillon avec un exosome marqué selon la revendication 7, comportant ledit complexe antigène-CMH, et la mise en évidence du marquage de lymphocytes T dans ledit échantillon.

43. Utilisation d'une vésicule selon la revendication 7 pour l'amplification clonale et/ou la stimulation ex vivo de lymphocytes T cytotoxiques ou auxiliaires.

44. Utilisation d'une vésicule selon l'une des revendications 11 à 16 pour la préparation d'une composition destinée à véhiculer ladite molécule vers une cellule.

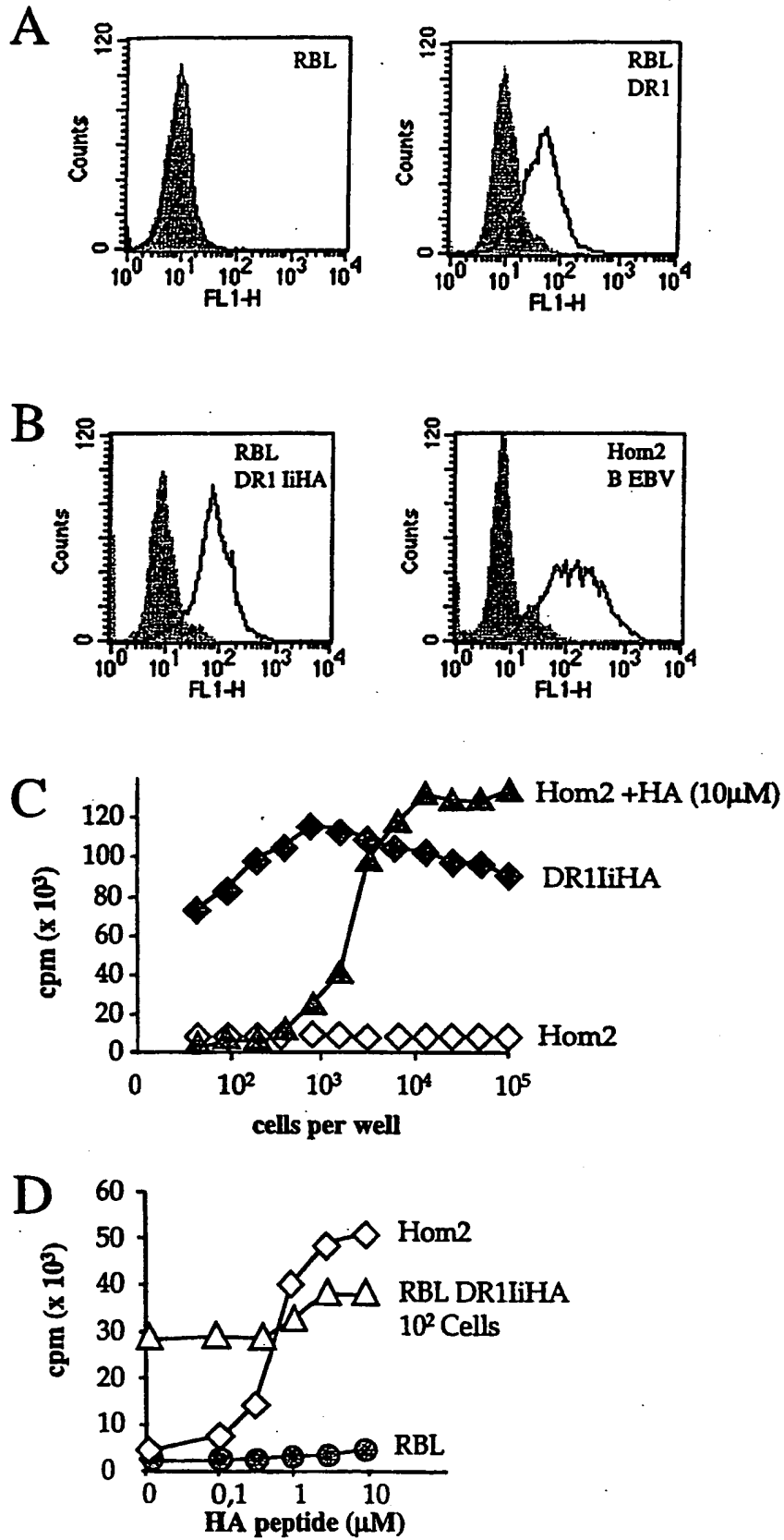
45. Composition comprenant un ou plusieurs exosomes immobilisés sur un support.

46. Utilisation d'une vésicule membranaire selon l'une des revendications 1 à 16, notamment sous forme immobilisée sur un support, pour la purification de cellules.

This Page Blank (uspto)

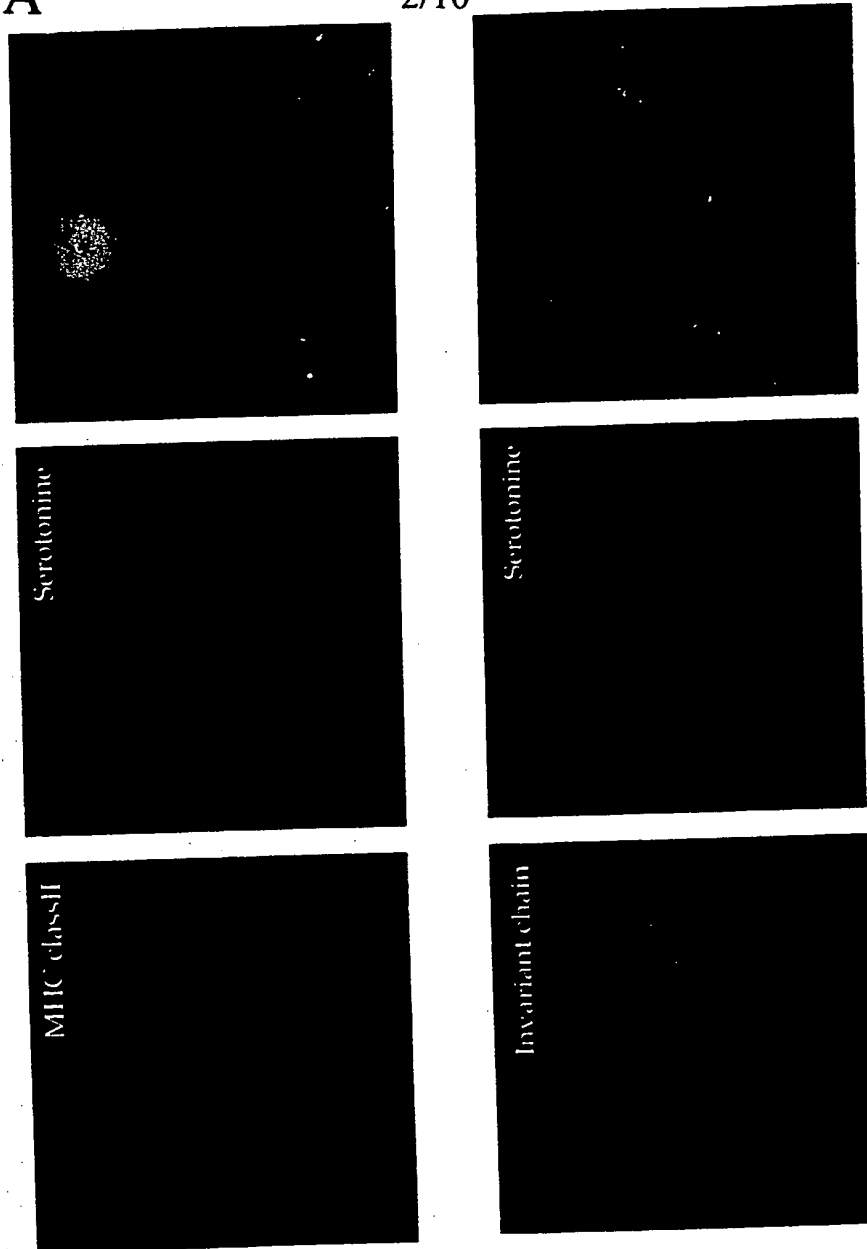
1/10

Figure 1



A

2/10



B

DR1liHA

HOM2

cells exosomes

47 -



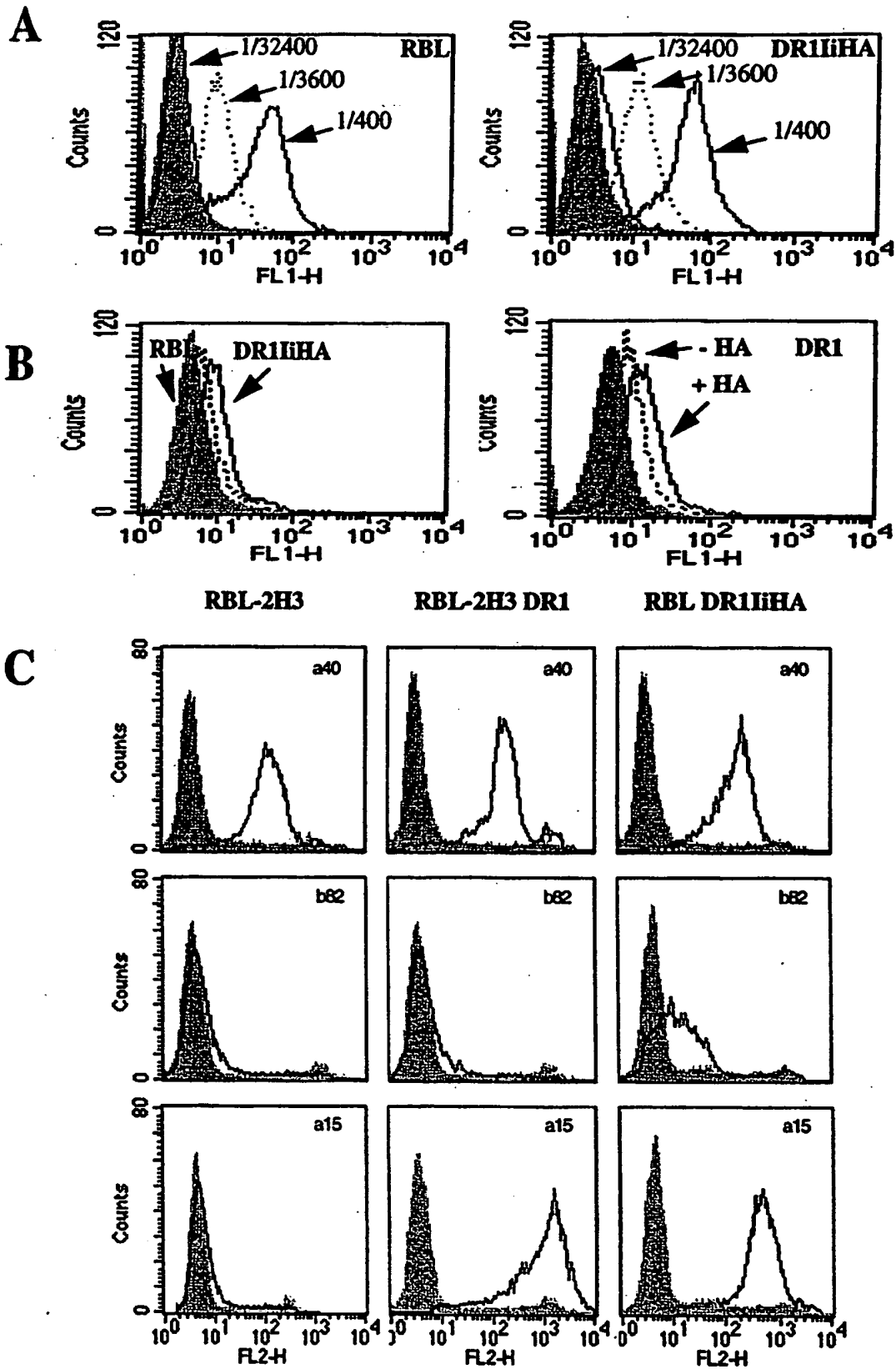
← β DR1

30 -

Figure 2

Figure 3

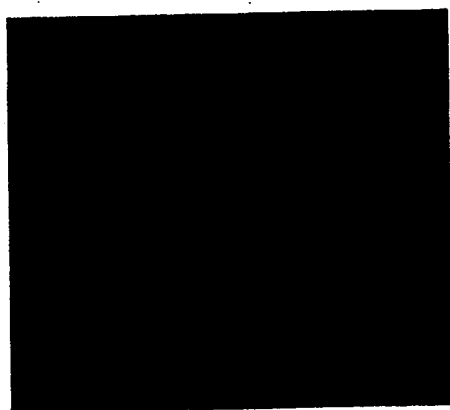
3/10



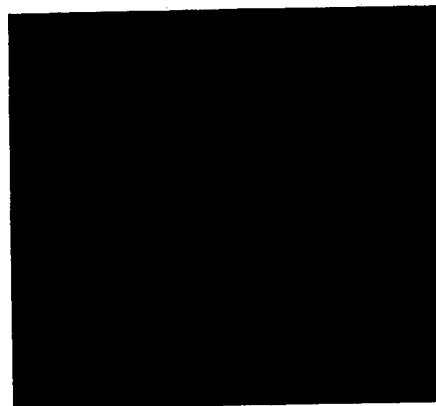
4/10

Figure 4

A

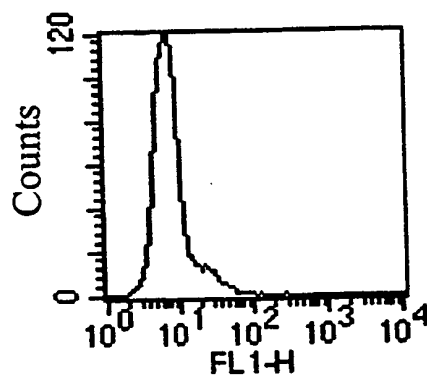


B



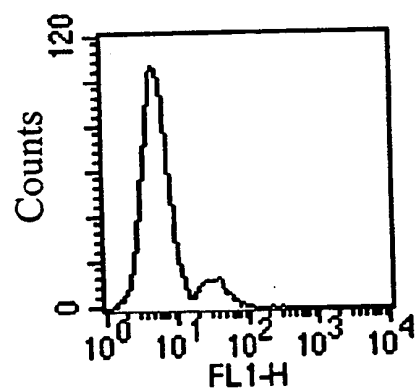
C

THA



D

TH 30



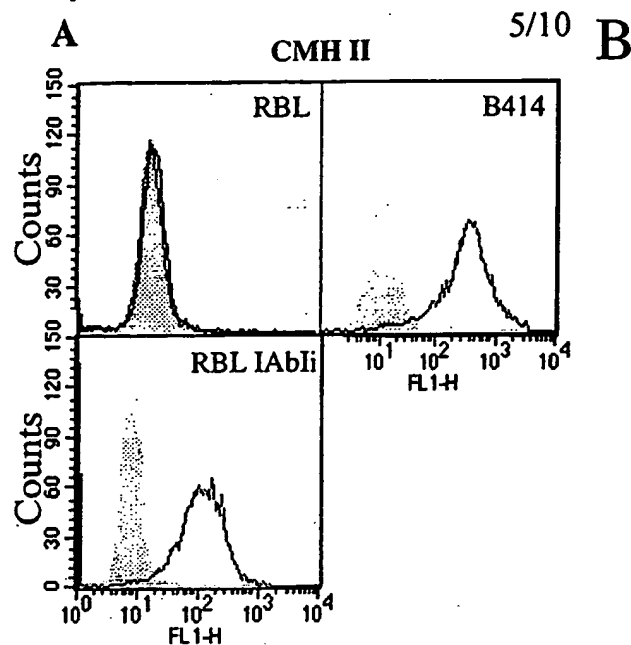
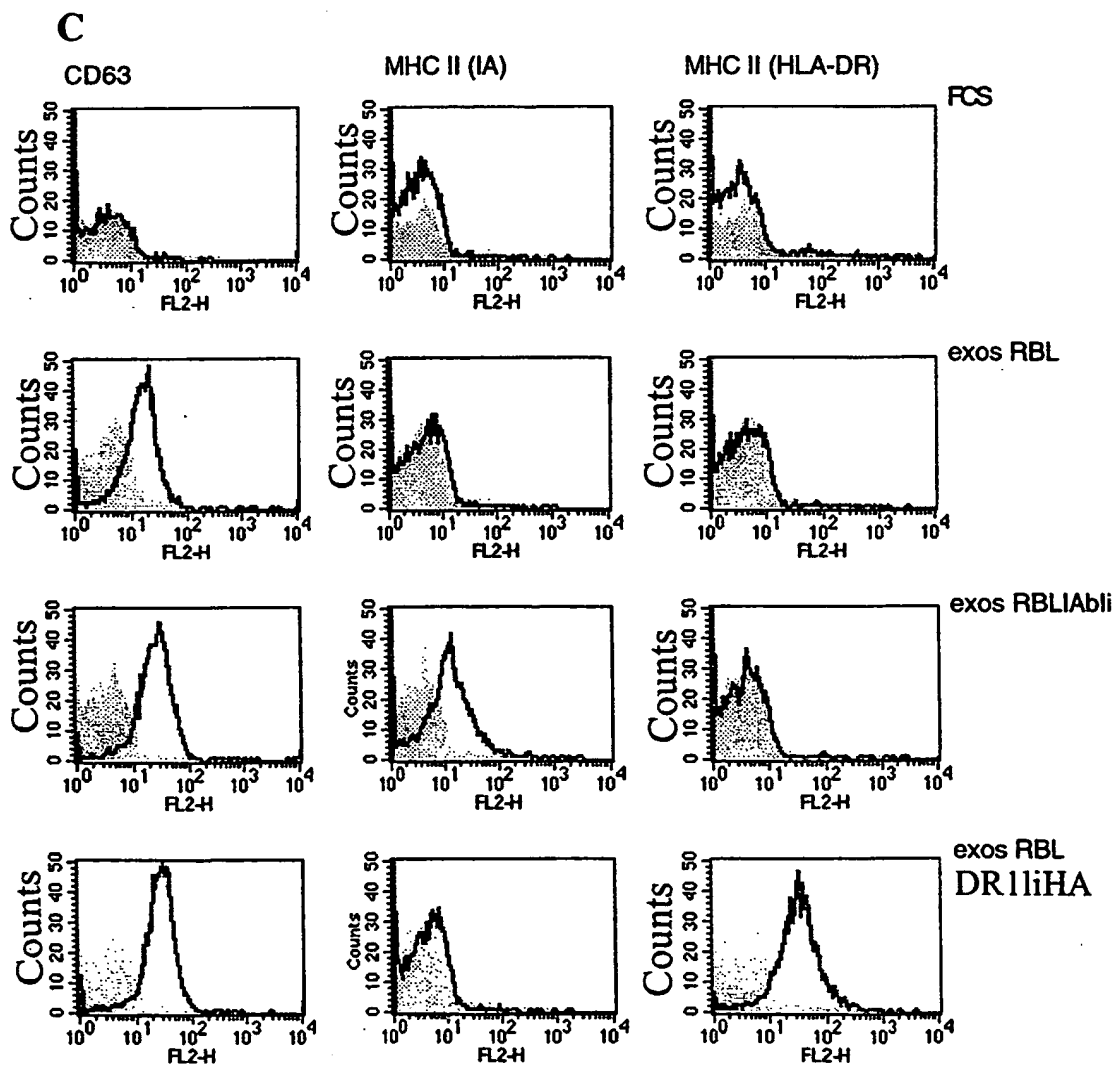
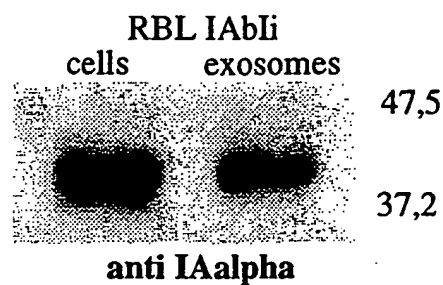


FIGURE 5



6/10



FIG 6A

Figure 6

7/10

FIG 6B

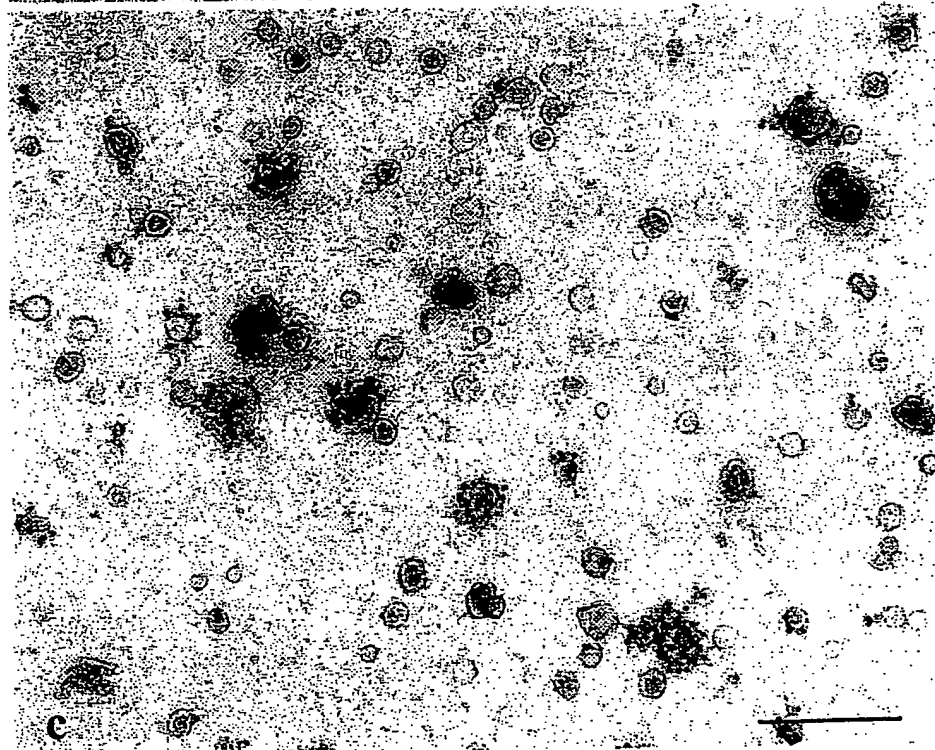
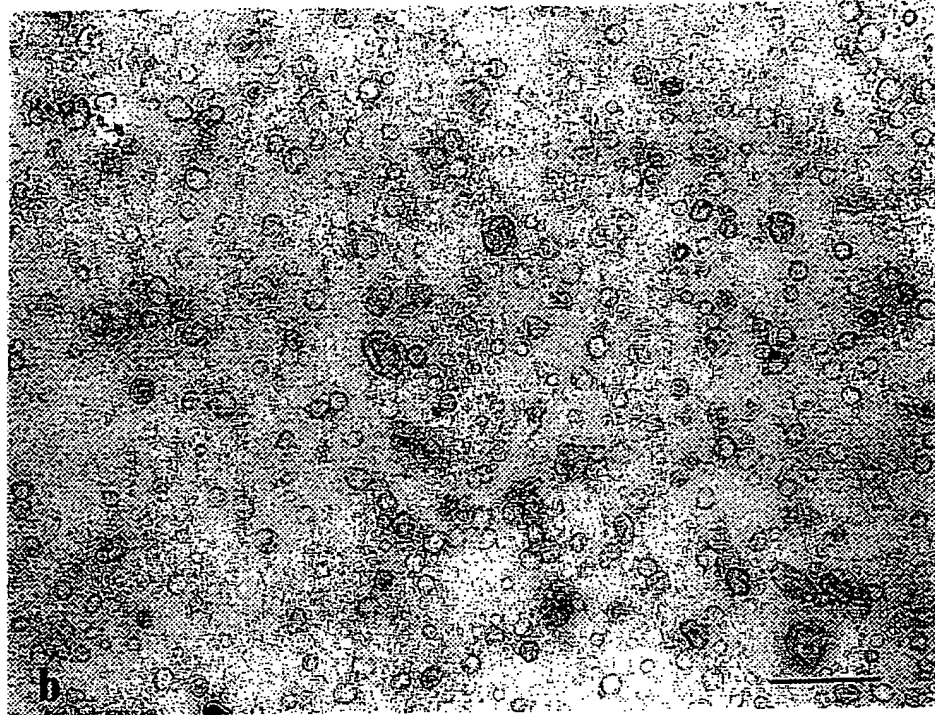


FIG 6C

8/10

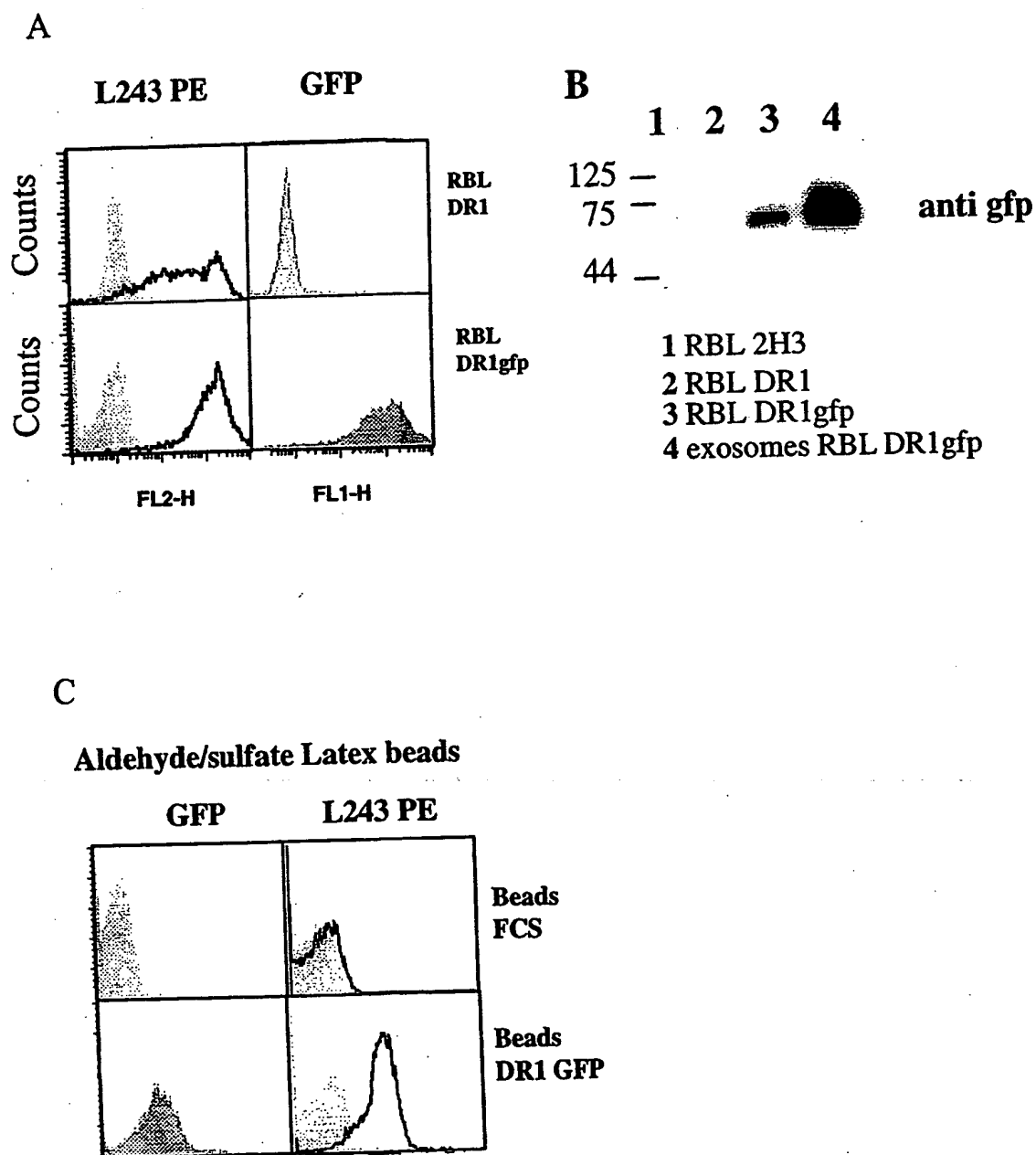


Figure 7

10/10

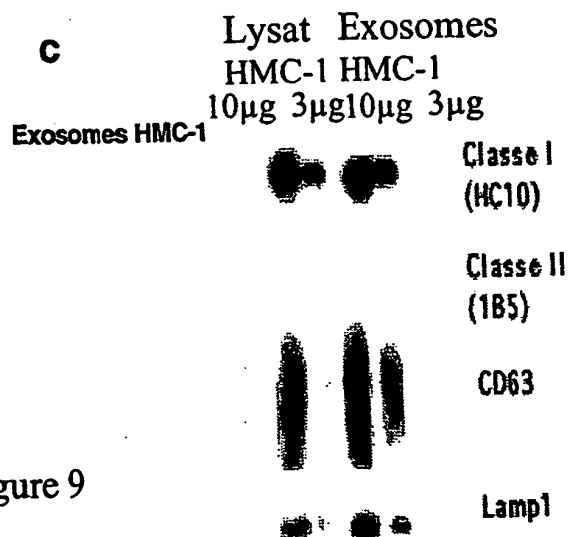
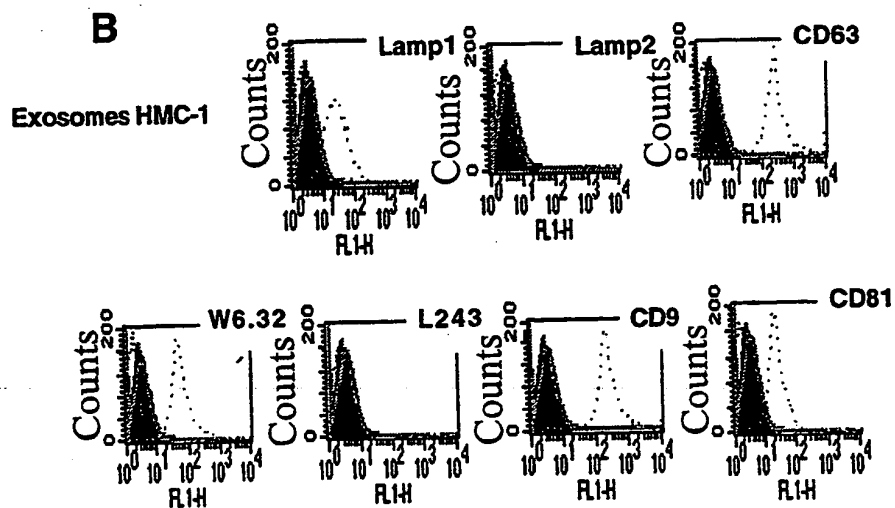
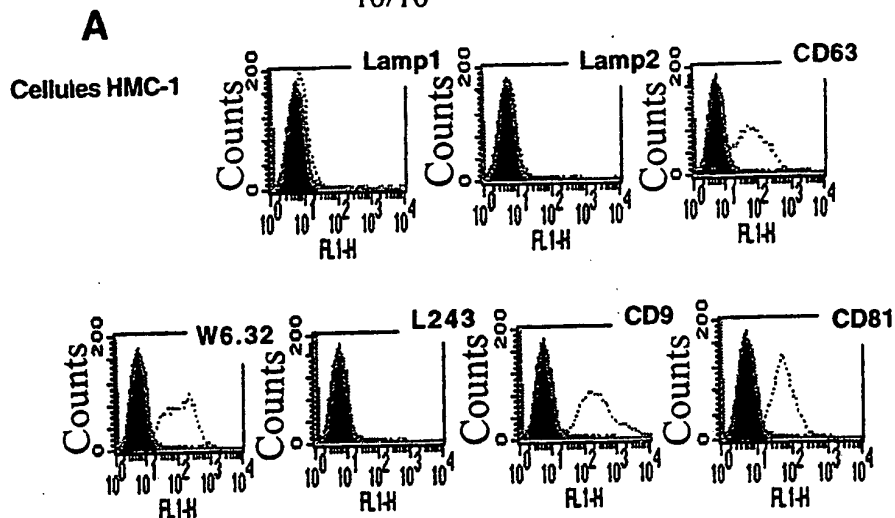


Figure 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 99/02691

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 C12N5/10 A61K39/385 C07K16/00 C12N15/12 G01N33/50
 A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 05900 A (RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN ET AL.) 20 February 1997 (1997-02-20) page 6, line 13 - line 32; claims	1-7, 17, 20
A	G. RAPOSO ET AL.: "ACCUMULATION OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS II MOLECULES IN MAST CELL SECRETORY GRANULES AND THEIR RELEASE UPON DEGRANULATION." MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, vol. 8, no. 12, December 1997 (1997-12), pages 2631-2645, XP002113183 BETHESDA, MD, US cited in the application page 2643, left-hand column, paragraph 2 -right-hand column, paragraph 1 -/-	1-46

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 April 2000

Date of mailing of the international search report

27/04/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ryckebosch, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/02691

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	G. RAPOSO ET AL.: "B LYMPHOCYTES SECRETE ANTIGEN-PRESENTING VESICLES." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 183, March 1996 (1996-03), pages 1161-1172, XP002060486 NEW YORK, N.Y., US cited in the application page 1170, right-hand column, paragraph 2	1-46
A	L. ZITVOGEL ET AL.: "ERADICATION OF ESTABLISHED MURINE TUMORS USING A NOVEL CELL-FREE VACCINE: DENDRITIC CELL-DERIVED EXOSOMES." NATURE MEDICINE, vol. 4, no. 5, May 1998 (1998-05), pages 594-600, XP002085387 new york, n.y., us cited in the application page 594, right-hand column, paragraph 1	1-46

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/02691

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9705900 A	20-02-1997	AU 6632496 A	05-03-1997
		CA 2225553 A	20-02-1997
		EP 0841945 A	20-05-1998
		JP 11510507 T	14-09-1999

This Page Blank (uspto)

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Dem: Internationale No

PCT/FR 99/02691

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N5/10 A61K39/385 C07K16/00 C12N15/12 G01N33/50
A61K39/395

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 97 05900 A (RIJSUNIVERSITEIT TE LEIDEN ET AL.) 20 février 1997 (1997-02-20) page 6, ligne 13 - ligne 32; revendications	1-7, 17, 20
A	G. RAPOSO ET AL.: "ACCUMULATION OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS II MOLECULES IN MAST CELL SECRETORY GRANULES AND THEIR RELEASE UPON DEGRANULATION." MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, vol. 8, no. 12, décembre 1997 (1997-12), pages 2631-2645, XP002113183 BETHESDA, MD, US cité dans la demande page 2643, colonne de gauche, alinéa 2 -colonne de droite, alinéa 1 -/-	1-46

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 avril 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

27/04/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Ryckebosch, A

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	G. RAPOSO ET AL.: "B LYMPHOCYTES SECRETE ANTIGEN-PRESENTING VESICLES." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 183, mars 1996 (1996-03), pages 1161-1172, XP002060486 NEW YORK, N.Y., US cité dans la demande page 1170, colonne de droite, alinéa 2 -----	1-46
A	L. ZITVOGEL ET AL.: "ERADICATION OF ESTABLISHED MURINE TUMORS USING A NOVEL CELL-FREE VACCINE: DENDRITIC CELL-DERIVED EXOSOMES." NATURE MEDICINE, vol. 4, no. 5, mai 1998 (1998-05), pages 594-600, XP002085387 new york, n.y., us cité dans la demande page 594, colonne de droite, alinéa 1 -----	1-46

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem: , Internationale No

PCT/FR 99/02691

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9705900 A	20-02-1997	AU 6632496 A	05-03-1997
		CA 2225553 A	20-02-1997
		EP 0841945 A	20-05-1998
		JP 11510507 T	14-09-1999

This Page Blank (uspto)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

RECU/RECEIVED

15 FEV. 2000

PCT

BECKER & ASSOCIES

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

CABINET BECKER ET ASSOCIES
10, rue de Milan
F-75009 Paris
FRANCE

NOTIFICATION RELATIVE A LA PRESENTATION OU A LA TRANSMISSION DU DOCUMENT DE PRIORITE

(instruction administrative 411 du PCT)

Date d'expédition (jour/mois/année) 31 janvier 2000 (31.01.00)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire B0018WO	
Demande internationale no PCT/FR99/02691 //	
Date de publication internationale (jour/mois/année) Pas encore publiée	
Date du dépôt international (jour/mois/année) 04 novembre 1999 (04.11.99)	Date de priorité (jour/mois/année) 05 novembre 1998 (05.11.98)
Déposant INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE etc	

- La date de réception (sauf lorsque les lettres "NR" figurent dans la colonne de droite) par le Bureau international du ou des documents de priorité correspondant à la ou aux demandes énumérées ci-après est notifiée au déposant. Sauf indication contraire consistant en un astérisque figurant à côté d'une date de réception, ou les lettres "NR" dans la colonne de droite, le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international d'une manière conforme à la règle 17.1.a) ou b).
- Ce formulaire met à jour et remplace toute notification relative à la présentation ou à la transmission du document de priorité qui a été envoyée précédemment.
- Un astérisque (*) figurant à côté d'une date de réception dans la colonne de droite signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international mais de manière non conforme à la règle 17.1.a) ou b). Dans ce cas, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.
- Les lettres "NR" figurant dans la colonne de droite signalent un document de priorité que le Bureau international n'a pas reçu ou que le déposant n'a pas demandé à l'office récepteur de préparer et de transmettre au Bureau international conformément à la règle 17.1.a) ou b), respectivement. Dans ce cas, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

Date de priorité	Demande de priorité n°	Pays, office régional ou office récepteur selon le PCT	Date de réception du document de priorité
05 nove 1998 (05.11.98)	98/13946	FR	20 decé 1999 (20.12.99)

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:

Marc Salzman

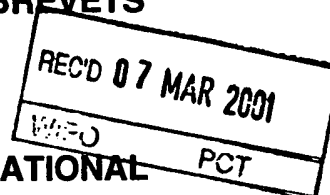
no de téléphone (41-22) 338.83.38

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)



Référence du dossier du déposant ou du mandataire B0018WO	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/02691	Date du dépôt international (jour/mois/année) 04/11/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 05/11/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N5/10		
Déposant INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RE..et al.		



1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 10 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.

☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 5 feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☒ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 22/04/2000	Date d'achèvement du présent rapport 02.03.01
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Buchet, A N° de téléphone +49 89 2399 7401 

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02691

I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17).*) :

Description, pages:

1-44 version initiale

Revendications, N°:

1-47 reçue(s) le 08/01/2001 avec la lettre du 03/01/2001

Dessins, feuilles:

1/10-10/10 version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02691

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

IV. Absence d'unité de l'invention

1. En réponse à l'invitation à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles, le déposant a

- ☐ limité les revendications.
- ☐ payé des taxes additionnelles.
- ☐ payé des taxes additionnelles sous réserve.
- ☐ ni limité les revendications ni payé des taxes additionnelles.

2. ☒ L'administration chargée de l'examen préliminaire international estime qu'il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité d'invention et décide, conformément à la règle 68.1, de ne pas inviter le déposant à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles.

3. L'administration chargée de l'examen préliminaire international estime que, aux termes des règles 13.1, 13.2 et 13.3,

- ☐ il est satisfait à l'exigence d'unité de l'invention.
- ☒ il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité de l'invention, et ce pour les raisons suivantes :
voir feuille séparée

4. En conséquence, les parties suivantes de la demande internationale ont fait l'objet d'un examen préliminaire international lors de la formulation du présent rapport :

- ☒ toutes les parties de la demande.
- ☐ les parties relatives aux revendications n°s .

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02691

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 3, 5, 9-11, 16-31, 35, 40, 42, 46-47 Non : Revendications 1-2, 4, 6-8, 12-15, 32-24, 36-39, 41, 43-45
Activité inventive	Oui : Revendications Non : Revendications 1-47
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-47 Non : Revendications

**2. Citations et explications
voir feuille séparée**

VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :
voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée

RAPPORT D'EXAMEN

Demande internationale n° PCT/FR99/02691

PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE

Il est fait référence aux documents suivants:

- D1: WO 97 05900 A
- D2: Molecular Biology of the Cell
vol. 8, n° 12, 1997, pp 2631-2645
- D3: Nature Medicine
vol. 4, n° 5, 1998, pp 594-600

Concernant le point IV

Absence d'unité de l'invention

- Les caractéristiques techniques essentielles (voir aussi Points V-1 et VIII) des différentes revendications indépendantes suivantes, appartenant à l'invention, sont:

- . revendication 1: vésicule membranaire comportant une molécule du **CMH humain**.
- . revendication 12: vésicule membranaire comportant une ou plusieurs molécules **hétérologues**.
- . revendication 21: procédé de production d'exosomes par culture d'une cellule comportant un **acide nucléique recombinant** codant pour une molécule **définie**.
- . revendications 36 et 37: utilisation d'**anticorps** obtenus à partir de vésicules.
- . revendication 45: composition comprenant des exosomes **immobilisés** sur un support.

- Ostensiblement, les produits ou méthodes décrites dans ces différentes revendications indépendantes résolvent des problèmes techniques différents ou si un lien peut être établi entre elles, il n'est pas nouveau ou ne relève d'aucune activité inventive (voir ci-dessous Point V).

De ce fait, la présente application ne respecte pas la règle d'unité de l'invention (Règle 13 PCT).

Concernant le point V

Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1) Nouveauté:

- D1 fournit de nouveaux outils, à savoir des véhicules, pour la vaccination (revendication 7). Il s'agit des exosomes, vésicules membranaires riches en molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), sécrétés par les cellules présentatrices d'antigènes. Ainsi après endocytose et clivage, un antigène endogène ou exogène est pris en charge par le CMH de classe I ou II, respectivement, et présenté à la surface des exosomes dans une configuration lui conférant un fort pouvoir immunogène (revendication 4). Alternativement, le peptide peut être pris en charge par le CMH après son incubation avec des exosomes "vides" (p 6, l 33- p 7, l 2). Différents types cellulaires sont capables de former des exosomes: lymphocytes B, macrophages ou cellules dendritiques (revendication 6), notamment de source humaine (Fig. 1). Un exosome portant à sa surface un peptide d'intérêt est capable d'induire une réponse par les lymphocytes T spécifiques (revendication 10). Par exemple, un exosome, riche en molécules du CMH de classe II car issu d'un réticulocyte et arborant le peptide 418-427 de l'antigène HSP65 de *Mycobacterium Leprae*, active le clone 2F10 capable de reconnaître ce peptide dans le contexte HLADR15 (Fig. 4). Cette réponse du système immunitaire cellulaire peut être bloquée par l'ajout d'anticorps anti-HLA-DR. Afin de contrôler davantage la présentation des antigènes à la surface des exosomes, il est proposé d'introduire les gènes codant le CMH dans les cellules productrices d'exosomes ou de construire des exosomes purement synthétiques à partir de liposomes (p 6, l 25-32).

- La précision du procédé mis en oeuvre pour obtenir un produit ne suffit pas à rendre ce produit nouveau. Ainsi, l'expression "produite par une cellule modifiée génétiquement" ne confère aucune caractéristique particulière aux vésicules de la revendication 1. Cette expression est redondante avec le terme "recombinant" qui lui-même ne confère aucune propriété particulière aux molécules du CMH correspondantes (voir aussi Point VIII-1). Ainsi, les vésicules membranaires analysées aux figures Fig. 1 et 2 de D1 répondent aux critères des revendications 1-2, 4 et 7-8.

- Par ailleurs, la mention de la source de la vésicule revendiquée à la revendication 12 ("obtenue à partir d'une cellule de mastocyte") n'implique aucune caractéristique technique particulière pour ladite vésicule (voir aussi Point VIII-1), à part celle de posséder des molécules du CMH de classe II à sa surface (voir D2), comme pour les exosomes décrits dans D1. Ceci est d'autant plus vrai que l'expression "dérivée" est

RAPPORT D'EXAMEN

Demande internationale n° PCT/FR99/02691

PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE

très large et vague (voir aussi Point VIII-2). Ainsi, le peptide 418-427 de l'antigène HSP65 de *Mycobacterium Leprae* peut être considéré comme une "molécule hétérologue d'intérêt", rendant l'objet des revendications 12-14 non nouveau.

- Les revendications 36 et 37 manquent de caractéristiques techniques définissant les anticorps concernés. La manière dont ils sont obtenus ne leur confère pas nécessairement des qualités particulières. Ainsi, leur nouveauté, en particulier vis-à-vis de ceux obtenus avec des peptides pris en charge par des molécules naturelles du CMH, est contestée. De ce fait, l'utilisation de l'anticorps anti-HLA-DR décrit dans D1 anticipe l'objet des revendications 36 et 37.
- Les coupes présentées à la Fig. 1 correspondent à des exosomes "immobilisés sur un support", comme indiqué à la revendication 45.
- Pour les raisons mentionnées ci-dessus, l'objet des revendications 1-2, 4, 7-8, 12-14, 32-34, 36-37, 39 et 43-45 n'est pas nouveau au vu de D1.

- D2 étudie les vésicules membranaires sécrétées par les mastocytes issus de la moelle épinière d'une souris. Elles sont riches en molécules du MHC de classe II (p 2633, Fig. 1) et leur sécrétion dans le milieu extracellulaire est induite par l'ajout d'IgE capable de se fixer sur les récepteurs présents à leur surface (p 2642, Fig. 7).

- Le complexe IgE-antigène utilisé dans D2 est considéré comme "une molécule hétérologue d'intérêt", liée aux vésicules membranaires du mastocyte par interaction avec le récepteur de haute affinité. De ce fait, l'objet des revendications 12 -15, 32, 38 et 41 n'est pas nouveau.

- D3 rapporte que les cellules dendritiques, par exemple d'origine humaine, sécrètent des exosomes présentant à leur surface des récepteurs à la transferrine mais surtout des molécules du CMH à la fois des classes I et II (p 596, Fig. 2 et 3). Effectivement, un exosome portant le peptide (27-32) MART-1/MelanA est capable d'activer un clone HLA-A2 spécifique de lymphocytes T cytotoxiques et entraîne une stimulation de la production de IFN γ (p 595, colonne de gauche, l 22-30). Ce système offre des perspectives pour le traitement du cancer.

- Le terme "recombinant" utilisé dans la revendication 1 ne confère aucune propriété

particulière aux molécules de CMH correspondantes (voir aussi Point VIII-1). Ainsi, les vésicules membranaires décrites dans D3 répondent aux critères des revendications 1 et 6-7. D3 anticipe donc le contenu des revendications 1, 6-7, 32, 38-39 et 43-44.

- Pour les raisons mentionnées ci-dessus, les revendications 1-2, 4, 6-8, 12-15, 32-34, 36-39, 41 et 43-45 ne remplissent pas les conditions de nouveauté énoncées à l'Article 33.2 PCT.

2) Activité inventive:

- Bien que nouveau, l'objet des revendications 3, 5, 9-11, 16-31, 35, 40, 42 et 46-47 ne semble pas pouvoir servir de base à la reconnaissance d'une activité inventive:

- Le problème technique que se propose de résoudre la présente demande est l'obtention de vésicules membranaires de composition contrôlée.

- La solution décrite dans la présente invention est l'utilisation de cellules productrices d'exosomes, en particulier des souches de mastocytes (A: revendications 18-19, 22 et 29) produisant peu de molécules de CMH (B: revendications 11 et 30), transformées par des ADN recombinants codant un produit d'intérêt (C: revendications 21 et 24) - à savoir des molécules du CMH (revendications 3, 5, 17, 20 et 26-28), une molécule de purification (revendication 9) ou un marqueur (revendication 10)- qui sera exprimé dans les exosomes, éventuellement à l'aide d'un signal d'adressage (D: revendications 16, 23, 25 et 31). De tels exosomes, éventuellement immobilisés sur des billes (E: revendication 47) pourront avoir diverses applications (F): obtenir des anticorps (revendication 35), détecter des complexes spécifiques du récepteur TcR (revendication 40) et des lymphocytes T spécifiques d'un complexe antigène-CMH (revendication 42), ou purifier des cellules (revendication 46).

- D1 anticipe l'essence-même de l'invention puisqu'il est proposé dans ce document d'introduire les gènes codant le CMH dans les cellules productrices d'exosomes, afin de contrôler davantage la présentation des antigènes à la surface des exosomes (p 6, l 25-32).

- La présente invention ne consiste donc qu'en une généralisation à toute molécule

RAPPORT D'EXAMEN

Demande internationale n° PCT/FR99/02691

PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE

d'intérêt (C) du principe déjà énoncé dans D1. Au vu de ce document, l'homme du métier aurait entrepris cette démarche avec des chances raisonnables de succès.

Les autres caractéristiques, présentes dans les revendications, semblent relever des connaissances et de la routine de l'homme du métier:

- L'utilisation avantageuse des mastocytes comme cellules productrices d'exosomes (A) est rapportée dans D2.
- L'absence de molécules de CMH endogènes (B) aurait été un avantage évident à l'homme du métier.
- La présence d'un signal d'adressage pour des protéines ancrées dans les membranes des exosomes étant connue, leur utilisation (D) pour assurer la localisation correcte d'une protéine d'intérêt aurait été une démarche de routine pour l'homme du métier.
- L'immobilisation de vésicules (E) est considérée comme une mesure de routine.
- Les applications envisagées (F) sont courantes dans ce domaine technique et déjà utilisées avec des vésicules présentant naturellement les propriétés requises.
- De ce fait, il est considéré que les revendications 1 à 47 ne remplissent pas les conditions énoncées à l'Article 33.3 PCT.

Concernant le point VII

Irrégularités dans la demande internationale

Contrairement à ce qu'exige la règle 5.1 a) ii) PCT, la description n'indique pas l'état de la technique antérieure pertinent exposé dans le document D1 et ne cite pas ce document.

Concernant le point VIII

Observations relatives à la demande internationale

- 1) Comme mentionné au Point V-1, l'origine ("recombinante", revendications 1-7, 9; "produite par une cellule modifiée génétiquement", revendication 1;) ou la source ("obtenue à partir d'une cellule de mastocyte ou dérivée de mastocyte modifiée

REVENDICATIONS

1. Vésicule membranaire produite par une cellule modifiée génétiquement, ladite vésicule comportant une molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité humain.
2. Vésicule selon la revendication 1 caractérisée en ce que la molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité est une molécule de classe II.
3. Vésicule selon la revendication 2 caractérisée en ce que la molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II est une chaîne α .
4. Vésicule selon la revendication 2 caractérisée en ce que la molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II comprend une chaîne α et une chaîne β .
5. Vésicule selon l'une des revendications 2 à 4 caractérisée en ce que la molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II est choisie parmi les sérotypes DR1 à DR13, de préférence DR1 à DR7.
6. Vésicule selon la revendication 1 caractérisée en ce que la molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité est une molécule de classe I.
7. Vésicule selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisée en ce qu'elle comporte un complexe entre un peptide défini et la molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité.
8. Vésicule selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre une ou plusieurs molécules hétérologues d'intérêt.
9. Vésicule selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre un peptide ou une protéine recombinant permettant sa purification.
10. Vésicule selon les revendications précédentes caractérisées en ce qu'elle comporte un marqueur.
11. Vésicule selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement dépourvue de molécules du CMH endogène.
12. Vésicule membranaire caractérisée en ce qu'elle est obtenue à partir d'une cellule de mastocyte ou dérivée de mastocyte modifiée génétiquement, et en ce qu'elle comporte une ou plusieurs molécules hétérologues d'intérêt.
13. Vésicule selon la revendication 12, caractérisée en ce que la molécule d'intérêt est une protéine, un polypeptide, un peptide, un acide nucléique, un lipide ou une substance de nature chimique, biologique ou synthétique.

14. Vésicule membranaire selon la revendication 13, caractérisée en ce que la molécule hétérologue est une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité, un antigène, un ligand de récepteur, un récepteur de ligand, un acide nucléique, un produit pharmacologique, un marqueur et/ou un peptide de purification.

5 15. Vésicule selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'elle exprime un récepteur de ligand et en ce qu'elle comporte une autre molécule hétérologue d'intérêt.

16. Vésicule membranaire selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comporte une molécule recombinante de fusion entre un polypeptide d'intérêt et un signal d'adressage.

10 17. Cellule productrice d'exosomes, caractérisée en ce qu'elle comporte un ou plusieurs acides nucléiques recombinants codant pour une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité.

18. Cellule selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule de mastocyte.

15 19. Cellule selon la revendication 18, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une lignée mastocytaire d'une leucémie à basophile, notamment de la lignée RBL, de préférence RBL-2H3.

20 20. Cellule selon l'une des revendications 17 à 19, caractérisée en ce qu'elle comporte un acide nucléique recombinant codant pour une chaîne α et/ou une chaîne β d'une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II et/ou pour une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I.

21. Procédé de production d'une vésicule membranaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, comportant une molécule recombinante définie, comprenant les étapes suivantes:

25 a) la culture d'une cellule de mastocyte ou dérivée de mastocyte comportant un acide nucléique recombinant codant pour ladite molécule recombinante définie,

c) la récupération des vésicules produits par lesdites cellules, ces vésicules comprenant ladite molécule recombinante définie.

30 22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce qu'il comprend une étape intermédiaire b) au cours de laquelle les cellules sont stimulées pour induire et/ou augmenter la sécrétion des exosomes..

23. Procédé selon la revendication 21 ou 22 caractérisé en ce que la molécule recombinante définie est exposée à l'extérieur de l'exosome, ou est incluse, en partie ou en totalité, dans la fraction cytosolique de l'exosome.

24. Procédé selon l'une des revendications 21 à 23, caractérisé en ce que la molécule recombinante est une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité, une molécule antigénique, un ligand de récepteur, un récepteur de ligand, un peptide de purification ou tout autre polypeptide d'intérêt.

5 25. Procédé selon l'une des revendications 21 à 24 caractérisé en ce que l'acide nucléique comprend en outre une région codant pour un signal d'adressage vers les compartiments membranaires du mastocyte.

26. Procédé de préparation d'un exosome comportant un complexe peptide-CMH de composition définie, caractérisé en ce qu'il comprend:

- 10 - la culture d'une cellule productrice d'exosomes comprenant un ou plusieurs acides nucléiques recombinants codant pour une molécule recombinante définie du CMH,
 - la stimulation des cellules pour induire une libération des exosomes,
 - la récupération des exosomes produits par lesdites cellules, ces exosomes exprimant à leur surface ladite molécule recombinante définie du CMH, et,
 15 - la mise en contact des exosomes avec le ou les peptides.

27. Procédé de préparation d'un exosome comportant un complexe peptide-CMH de composition définie, caractérisé en ce qu'il comprend:

- 20 - la culture d'une cellule productrice d'exosomes comportant un ou plusieurs acides nucléiques recombinants codant pour une molécule recombinante définie du CMH et un acide nucléique comprenant une région codant pour un peptide recombinant défini,
 - la stimulation des cellules pour induire une libération des exosomes,
 - la récupération des exosomes produits par lesdites cellules, ces exosomes exprimant à leur surface ladite molécule recombinante définie du CMH associée audit peptide recombinant.

25 28. Procédé selon la revendication 27, caractérisé en ce que l'acide nucléique codant pour le peptide recombinant code pour un dérivé de la chaîne invariante λ , dans lequel la région CLIP a été délétée et substituée par ledit peptide.

29. Procédé selon l'une des revendications 26 à 28 caractérisé en ce que la cellule productrice est une cellule de mastocyte ou dérivée de mastocyte.

30 30. Procédé selon l'une des revendications 26 à 29 caractérisé en ce que la cellule productrice est essentiellement dépourvue de molécule du CMH endogène.

31. Procédé de modification de la composition d'un exosome, comprenant

- 35 - l'introduction dans une cellule productrice d'exosomes d'un acide nucléique codant pour une molécule définie, liée à un signal d'adressage dans les compartiments membranaires, et,

- la production d'exosomes à partir de ladite cellule.

32. Composition comprenant une ou plusieurs vésicules membranaires selon l'une des revendications 1 à 16.

33. Utilisation d'une vésicule selon l'une des revendications 1 à 16 pour la production d'anticorps, polyclonaux et/ou monoclonaux.

34. Procédé de production d'anticorps, comprenant l'immunisation d'un animal avec une vésicule selon la revendication 7 et la récupération des anticorps et/ou des cellules produisant des anticorps ou impliquées dans la réponse immunitaire.

35. Procédé selon la revendication 34, pour la production d'anticorps monoclonaux, notamment spécifiques de l'association CMH-peptide.

36. Utilisation d'un anticorps obtenu selon la revendication 34 ou 35, ou d'un fragment d'un tel anticorps, pour la détection, dans un échantillon biologique, de la présence d'antigènes spécifiques correspondants.

37. Utilisation d'un anticorps produit selon la revendication 34 ou 35, d'un fragment d'un tel anticorps, ou d'une vésicule selon la revendication 1 pour la préparation d'une composition thérapeutique destinée à inhiber l'interaction entre le récepteur d'un lymphocyte T et le complexe CMH-peptide pour lequel il est spécifique.

38. Utilisation d'une vésicule membranaire selon l'une des revendications 1 à 16 pour la détection *in vitro* ou *ex vivo* de partenaires spécifiques d'une molécule protéique dans un échantillon biologique.

39. Utilisation selon la revendication 38 d'un exosome portant un complexe CMH-peptide pour la détection de lymphocytes T spécifiques de ce complexe dans un échantillon biologique.

40. Utilisation selon la revendication 38 d'un exosome portant un récepteur TcR pour la détection de complexes peptide-CMH spécifiques de ce récepteur dans un échantillon biologique.

41. Utilisation selon la revendication 38 d'un exosome portant un récepteur de ligand pour la détection de la présence dudit ligand dans un échantillon biologique.

42. Méthode pour la détection *in vitro* ou *ex vivo* de la présence de lymphocytes T spécifiques de complexes antigène-CMH dans un échantillon biologique, comprenant la mise en contact dudit échantillon avec un exosome marqué selon la revendication 7, comportant ledit complexe antigène-CMH, et la mise en évidence du marquage de lymphocytes T dans ledit échantillon.

43. Utilisation d'une vésicule selon la revendication 7 pour l'amplification clonale et/ou la stimulation *ex vivo* de lymphocytes T cytotoxiques ou auxiliaires.

44. Utilisation d'une vésicule selon l'une des revendications 12 à 16 pour la préparation d'une composition destinée à véhiculer ladite molécule vers une cellule.

45. Composition comprenant une ou plusieurs vésicules membranaires immobilisées sur un support.

5 46. Utilisation d'une vésicule membranaire selon l'une des revendications 1 à 16, notamment sous forme immobilisée sur un support, pour la purification de cellules.

47. Composition selon la revendication 45, comprenant une ou plusieurs vésicules membranaires immobilisées sur une bille, notamment une bille en latex ou une bille magnétique.

10

RAPPORT D'EXAMEN

Demande internationale n° PCT/FR99/02691

PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPAREE

génétiquement", revendication 12) des vésicules revendiquées ne suffisent pas à les rendre nouvelles. Ainsi, il paraît difficile de pouvoir définir ces vésicules par des caractéristiques techniques (Article 6 PCT), les rendant nouvelles et inventives. En effet, même si elle sont obtenues par une méthode nouvelle et inventive, les vésicules en tant que telles auraient pu être trouvées dans un environnement naturel adapté ou auraient pu être obtenues synthétiquement, comme proposé dans D1.

2) Les termes "dérivée" (revendications 12, 21 et 29; voir aussi Point V-1) et "essentiellement" (revendications 11 et 30) sont si vagues et si peu clairs qu'ils entraînent un doute quant à l'étendue de l'invention pour laquelle une protection est recherchée (Article 6 PCT).

3) L'expression "échantillon biologique" utilisée dans les revendications 36 et 39 à 42 n'exclut pas d'une manière explicite une utilisation *in vivo* qui serait, en l'absence de clarification (Article 6 PCT), visée par les dispositions de la Règle 67.1 (iv) PCT.

4) Il est à noter qu'une caractéristique introduite par l'expression "de préférence" (revendications 5 et 19) ou "notamment" (revendications 19, 35 et 46-47) n'est pas prise en considération pour la définition de l'étendue de l'invention.

CERTIFICATE

I, Martine NION,

of Cabinet Becker & Associés
10 rue de Milan
F-75009 PARIS (France),

do hereby declare that I am conversant with the French and English Languages,
and that the attached translation signed by me is, to the best of my knowledge and
belief, a true and correct translation of the Annexes to the International
Preliminary Examination Report concerning International Patent application
PCT/FR 99/02691 (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, et
al.)

Dated : April 4, 2001

Signed : 
Martine NION

Translation
09/831112

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

RECEIVED
NOV 21 2001
TECH CENTER 1600/2900

Applicant's or agent's file reference B0018WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR99/02691	International filing date (day/month/year) 04 November 1999 (04.11.99)	Priority date (day/month/year) 05 November 1998 (05.11.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 5/10		
Applicant INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 10 sheets, including this cover sheet.
- ☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
- These annexes consist of a total of 5 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☒ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 22 April 2000 (22.04.00)	Date of completion of this report 02 March 2001 (02.03.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/02691

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☐ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

See Supplemental Box

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☒ all parts.
- ☐ the parts relating to claims Nos. _____

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/02691

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description: _____, as originally filed
 pages _____ 1-44
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims: _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of 03 January 2001 (03.01.2001)
 pages _____ 1-47
- ☒ the drawings: _____, as originally filed
 pages _____ 1/10-10/10
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description: _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item. These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

Supplemental Box
(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV

Lack of unity of the invention

- The essential technical features (see also Boxes V-1 and VIII) of the following independent claims relating to the invention are:

- Claim 1: membrane vesicle comprising a **human MHC** molecule;
- Claim 12: membrane vesicle comprising one or more **heterologous** molecules;
- Claim 21: method for producing exosomes via a culture of a cell comprising a **recombinant nucleic acid** coding for a **defined** molecule;
- Claims 36 and 37: the use of vesicle-derived antibodies;
- Claim 45: composition including exosomes **immobilized** on a support.

- Clearly, the substances or methods described in said independent claims solve different technical problems, and while a link may be established, it is not novel and does not involve an inventive step; see Box V below.

Therefore, the present application does not comply with the rule of unity of invention (PCT Rule 13).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 99/02691

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	3, 5, 9-11, 16-31, 35, 40, 42, 46-47	YES
	Claims	1-2, 4, 6-8, 12-15, 32-34, 36-39, 41, 43-45	NO
Inventive step (IS)	Claims	_____	YES
	Claims	1-47	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-47	YES
	Claims	_____	NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1: WO-A-97/05900;

D2: Molecular Biology of the Cell, Vol. 8, No. 12, 1997, pp. 2631-2645;

D3: Nature Medicine, Vol. 4, No. 5, pp. 594-600.

1) Novelty:

- D1 provides new tools, i.e., carriers, for vaccination (Claim 7). Said tools are exosomes, membrane vesicles rich in major histocompatibility complex (MHC) molecules, secreted by antigen-presenting cells. Thus after endocytosis and cleavage, an endogenous or exogenous antigen is taken up by the class I or II MHC, respectively, and presented on the surface of the exosomes in a configuration giving it a strong immunogenic capability (Claim 4). Alternatively, the peptide may be taken up by the MHC after incubating with "empty" exosomes (page 6, line 33 to page 7, line 2). Different types of cells can produce exosomes: B-lymphocytes, macrophages or dendritic cells (Claim 6), notably derived from humans

(Fig. 1). An exosome carrying a peptide of interest on its surface can induce a response by specific T-lymphocytes (Claim 10). For example, an MHC class II-enriched exosome, so called because it is derived from a reticulocyte and houses the peptide 418-427 from the antigen HSP65 of *Mycobacterium leprae*, activates the clone 2F10 which can recognize said peptide in the context of HLA-DR15 (Fig.4). This response of a cell immune system can be blocked by adding an anti-HLA-DR antibody. In order to control more effectively the presentation of antigens on the surface of exosomes, D1 suggests introducing MHC-coding genes into exosome-generating cells or making purely synthetic exosomes from liposomes (page 6, lines 25-32).

- Merely defining the method used to obtain a substance does not suffice to make this substance novel. Thus, the expression "generated by a genetically modified cell" does not impart any particular feature to the vesicles of Claim 1. Said expression is redundant, with the term "recombinant" which does not confer any particular property on the corresponding MHC molecules; see also Box VIII-1. Thus, the membrane vesicles assayed in Figs. 1 and 2 of D1 fulfil the criteria of Claims 1-2, 4 and 7-8.

- Further, the mention of the source of the vesicle claimed in Claim 12 ("obtained from a mast cell") does not suggest that said vesicle (see Box VIII-1) has a particular feature, save that of having class II MHC molecules on its surface (see D2), similarly to the exosomes described in D1. This is especially true since the term "derived" is vast and ambiguous; see also Box VIII-2. The peptide 418-427 of the antigen HSP 65 of *Mycobacterium leprae* can thus be considered to be a "heterologous molecule of interest"; consequently, the subject matter of Claims 12-14 is not novel.

- Claims 36 and 37 lack the technical features defining the relevant antibodies. The manner in which they are obtained does not necessarily give them any particular qualities. Thus, the novelty of said antibodies, particularly compared to those obtained from peptides taken up by natural MHC molecules, is challenged. Therefore, the use of the anti-HLA-DR antibody described in D1 anticipates the subject matter of Claims 36 and 37.

- The sections shown in Fig. 1 correspond to exosomes "immobilized on a support", as indicated in Claim 45.

- For the above-mentioned reasons, the subject matter of Claims 1-2, 4, 7-8, 12-14, 32-34, 36-37, 39 and 43-45 is not novel in view of D1.

- D2 studies the membrane vesicles secreted by mast cells derived from the bone marrow of a mouse which are MHC class II-enriched molecules (page 2633, Fig. 1). Their secretion into the extracellular surroundings is triggered by adding IgE that can bind onto receptors present on their surface (page 2642, Fig. 7).

- The IgE-antigen complex used in D2 is considered to be a "heterologous molecule of interest", linked to the membrane vesicles of the mast cells by interacting with the high-affinity receptor. Therefore, the subject matter of Claims 12-15, 32, 38 and 41 is not new.

- D3 discloses that the dendritic cells, for example of human origin, secrete exosomes presenting transferrin receptors at their surface, but especially, MHC class I and II molecules (page 596, Figs. 2 and 3). Indeed, an exosome bearing the peptide (27-32) MART-1/MelanA can

activate an HLA-A2 clone specific to cytotoxic T-lymphocytes and stimulates the production of IFN γ (page 595, left-hand column, lines 22-30). This system holds some prospects for the treatment of cancer.

- The term "recombinant" used in Claim 1 does not impart any particular property to corresponding MHC molecules (see also Box VIII-1). Thus, the membrane vesicles described in D3 meet the requirements of Claims 1 and 6-7. D3 thus anticipates the subject matter of Claims 1, 6-7, 32, 38-39 and 43-44.

- For the above-mentioned reasons, Claims 1-2, 4, 6-8, 12-15, 32-34, 36-39 and 43-45 do not comply with the requirements of novelty set forth in PCT Article 33 (2).

2) Inventive step:

- Although novel, the subject matter of Claims 3, 5, 9-11, 16-31, 35, 40, 42 and 46-47 does not appear to meet the requirements of inventive step.

- The technical problem that the present application aims to solve is that of obtaining membrane vesicles of controlled composition.

- The solution disclosed in the present invention is that of using exosome-producing cells, in particular mast cell strains (A: Claims 18-19, 22 and 29) generating few MHC molecules (B: Claims 11 and 30), transformed by recombinant DNA encoding a substance of interest (C: Claims 21 and 24) -- i.e., MHC molecules (Claims 3, 5, 17, 20 and 26-28), a purifying molecule (Claim 9) or a tracer (Claim 10) -- possibly expressed via an addressing signal in the

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 99/02691

exosomes (**D**: Claims 16, 23, 25 and 31). Said exosomes, possibly immobilized on beads (**E**: Claim 47) could have a plurality of applications (**F**): obtaining antibodies (Claim 35), detecting complexes specific to the TcR receptor (Claim 40) and T-lymphocytes specific to an MHC-antibody complex (Claim 42), or purifying cells (Claim 46).

- D1 anticipates the very essence of the invention since said document proposes that MHC-coding genes be inserted in exosome-producing cells with a view to further controlling the presentation of antigens on the surface of exosomes (page 6, lines 25-32).

- The present invention is thus only a generalization of the principle already stated in D1 regarding all molecules of interest (**C**). In view of said document, a person skilled in the art would have taken this step with reasonable chances of success.

The other features included in the claims appear to be common knowledge or routine practice for a person skilled in the art:

- The advantageous use of mast cells to produce exosomes (**A**) is disclosed in D2.

- The absence of endogenous MHC molecules (**B**) would have been an obvious advantage to a person skilled in the art.

- Since the presence of an addressing signal for proteins bound to the exosome membranes is known, their use (**D**) in ensuring the proper localization of a protein of interest would have been a routine measure for a person skilled in the art.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application no.

PCT/FR 99/02691

- The immobilization of vesicles (E) is considered to be a routine measure.
- The applications envisaged (F) are common in this field of technology and are already being practiced with vesicles naturally presenting the required properties.
- Therefore, Claims 1 to 47 do not meet the requirements of PCT Article 33(3).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 99/02691

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1 (a)(ii), the description does not cite D1 or indicate the relevant prior art disclosed therein.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 99/02691

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1) As stated in Box V-1, the origin ("recombinant", Claims 1-7, 9; "produced by a genetically modified cell", Claim 1) or the source ("obtained from a mast cell or derived from a genetically modified mast cell", Claim 12) of the claimed vesicles does not suffice to confer novelty. Thus, it appears difficult to define said vesicles by using technical features (PCT Article 6), making them novel and inventive. In fact, even if they are obtained by means of a new and inventive method, the vesicles as such could have been found in a natural, adapted medium or could have been obtained synthetically, as suggested in D1.

2) The terms "derived" (Claims 12, 21 and 29; see also Box V-1) and "essentially" (Claims 11 and 30) are so vague and imprecise that they create a doubt as to the scope of the invention for which protection is sought (PCT Article 6).

3) The term "biological sample" used in Claims 36 and 39 to 42, does not explicitly rule out an *in vivo* use under the provisions of PCT Rule 67(1)(iv), in the absence of clarification (PCT Article 6).

4) A feature introduced by the term "preferably" (Claims 5 and 19) or "notably" (Claims 19, 35 and 46-47), is not taken into account to define the scope of the invention.

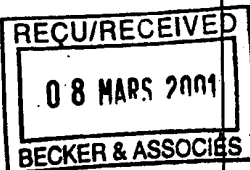
by fax and post

Expéditeur: L'ADMINISTRATION CHARGÉE DE
L'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

PCT

Destinataire:

CABINET BECKER & ASSOCIÉS
10, rue de Milan
F-75009 Paris
FRANCE



NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU
RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE
INTERNATIONAL

(règle 71.1 du PCT)

FAX NO: +33(0)144538410

Date d'expédition
(jour/mois/année)

02.03.01

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
B0018WO

NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale No.
PCT/FR99/02691

Date du dépôt international (jour/mois/année)
04/11/1999

Date de priorité (jour/mois/année)
05/11/1998

Déposant

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RE..et al.

1. Il est notifié au déposant que l'administration chargée de l'examen préliminaire international a établi le rapport d'examen préliminaire international pour la demande internationale et le lui transmet ci-joint, accompagné, le cas échéant, de ces annexes.
2. Une copie du présent rapport et, le cas échéant, de ses annexes est transmise au Bureau international pour communication à tous les offices élus.
3. Si tel ou tel office élu l'exige, le Bureau international établira une traduction en langue anglaise du rapport (à l'exclusion des annexes de celui-ci) et la transmettra aux offices intéressés.


4. RAPPEL

Pour aborder la phase nationale auprès de chaque office élu, le déposant doit accomplir certains actes (dépôt de traduction et paiement des taxes nationales) dans le délai de 30 mois à compter de la date de priorité (ou plus tard pour ce qui concerne certains offices) (article 39.1) (voir aussi le rappel envoyé par le Bureau international dans le formulaire PCT/IB/301).

Lorsqu'une traduction de la demande internationale doit être remise à un office élu, elle doit comporter la traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international. Il appartient au déposant d'établir la traduction en question et de la remettre directement à chaque office élu intéressé.

Pour plus de précisions en ce qui concerne les délais applicables et les exigences des offices élus, voir le Volume II du Guide du déposant du PCT.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen
préliminaire international

 Office européen des brevets
D-80298 Munich
Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Fonctionnaire autorisé

Büchler, S

Tél. +49 89 2399-8090



TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)



Référence du dossier du déposant ou du mandataire B0018WO	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/02691	Date du dépôt international (jour/mois/année) 04/11/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 05/11/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N5/10		
Déposant INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RE..et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 10 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 5 feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☒ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 22/04/2000	Date d'achèvement du présent rapport 02.03.01
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Buchet, A N° de téléphone +49 89 2399 7401 

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02691

I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17).):

Description, pages:

1-44 version initiale

Revendications, N°:

1-47 reçue(s) le 08/01/2001 avec la lettre du 03/01/2001

Dessins, feuilles:

1/10-10/10 version initiale

2. En ce qui concerne la langue, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les séquences de nucléotides ou d'acide aminés divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02691

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

IV. Absence d'unité de l'invention

1. En réponse à l'invitation à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles, le déposant a

- ☐ limité les revendications.
- ☐ payé des taxes additionnelles.
- ☐ payé des taxes additionnelles sous réserve.
- ☐ ni limité les revendications ni payé des taxes additionnelles.

2. ☒ L'administration chargée de l'examen préliminaire international estime qu'il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité d'invention et décide, conformément à la règle 68.1, de ne pas inviter le déposant à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles.

3. L'administration chargée de l'examen préliminaire international estime que, aux termes des règles 13.1, 13.2 et 13.3,

- ☐ il est satisfait à l'exigence d'unité de l'invention.
- ☒ il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité de l'invention, et ce pour les raisons suivantes :
voir feuille séparée

4. En conséquence, les parties suivantes de la demande internationale ont fait l'objet d'un examen préliminaire international lors de la formulation du présent rapport :

- ☒ toutes les parties de la demande.
- ☐ les parties relatives aux revendications n°s .

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02691

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 3, 5, 9-11, 16-31, 35, 40, 42, 46-47 Non : Revendications 1-2, 4, 6-8, 12-15, 32-24, 36-39, 41, 43-45
Activité inventive	Oui : Revendications Non : Revendications 1-47
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-47 Non : Revendications

**2. Citations et explications
voir feuille séparée**

VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :
voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée

Il est fait référence aux documents suivants:

- D1: WO 97 05900 A
- D2: Molecular Biology of the Cell
vol. 8, n° 12, 1997, pp 2631-2645
- D3: Nature Medicine
vol. 4, n° 5, 1998, pp 594-600

Concernant le point IV

Absence d'unité de l'invention

- Les caractéristiques techniques essentielles (voir aussi Points V-1 et VIII) des différentes revendications indépendantes suivantes, appartenant à l'invention, sont:

- . revendication 1: vésicule membranaire comportant une molécule du **CMH humain**.
- . revendication 12: vésicule membranaire comportant une ou plusieurs molécules **hétérologues**.
- . revendication 21: procédé de production d'exosomes par culture d'une cellule comportant un **acide nucléique recombinant** codant pour une molécule **définie**.
- . revendications 36 et 37: utilisation d'**anticorps** obtenus à partir de vésicules.
- . revendication 45: composition comprenant des exosomes **immobilisés** sur un support.

- Ostensiblement, les produits ou méthodes décrites dans ces différentes revendications indépendantes résolvent des problèmes techniques différents ou si un lien peut être établi entre elles, il n'est pas nouveau ou ne relève d'aucune activité inventive (voir ci-dessous Point V).

De ce fait, la présente application ne respecte pas la règle d'unité de l'invention (Règle 13 PCT).

Concernant le point V

Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1) Nouveauté:

- D1 fournit de nouveaux outils, à savoir des véhicules, pour la vaccination (revendication 7). Il s'agit des exosomes, vésicules membranaires riches en molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), sécrétés par les cellules présentatrices d'antigènes. Ainsi après endocytose et clivage, un antigène endogène ou exogène est pris en charge par le CMH de classe I ou II, respectivement, et présenté à la surface des exosomes dans une configuration lui conférant un fort pouvoir immunogène (revendication 4). Alternativement, le peptide peut être pris en charge par le CMH après son incubation avec des exosomes "vides" (p 6, l 33- p 7, l 2). Différents types cellulaires sont capables de former des exosomes: lymphocytes B, macrophages ou cellules dendritiques (revendication 6), notamment de source humaine (Fig. 1). Un exosome portant à sa surface un peptide d'intérêt est capable d'induire une réponse par les lymphocytes T spécifiques (revendication 10). Par exemple, un exosome, riche en molécules du CMH de classe II car issu d'un réticulocyte et arborant le peptide 418-427 de l'antigène HSP65 de *Mycobacterium Leprae*, active le clone 2F10 capable de reconnaître ce peptide dans le contexte HLADR15 (Fig. 4). Cette réponse du système immunitaire cellulaire peut être bloquée par l'ajout d'anticorps anti-HLA-DR. Afin de contrôler davantage la présentation des antigènes à la surface des exosomes, il est proposé d'introduire les gènes codant le CMH dans les cellules productrices d'exosomes ou de construire des exosomes purement synthétiques à partir de liposomes (p 6, l 25-32).

- La précision du procédé mis en oeuvre pour obtenir un produit ne suffit pas à rendre ce produit nouveau. Ainsi, l'expression "produite par une cellule modifiée génétiquement" ne confère aucune caractéristique particulière aux vésicules de la revendication 1. Cette expression est redondante avec le terme "recombinant" qui lui-même ne confère aucune propriété particulière aux molécules du CMH correspondantes (voir aussi Point VIII-1). Ainsi, les vésicules membranaires analysées aux figures Fig. 1 et 2 de D1 répondent aux critères des revendications 1-2, 4 et 7-8.

- Par ailleurs, la mention de la source de la vésicule revendiquée à la revendication 12 ("obtenue à partir d'une cellule de mastocyte") n'implique aucune caractéristique technique particulière pour ladite vésicule (voir aussi Point VIII-1), à part celle de posséder des molécules du CMH de classe II à sa surface (voir D2), comme pour les exosomes décrits dans D1. Ceci est d'autant plus vrai que l'expression "dérivée" est

très large et vague (voir aussi Point VIII-2). Ainsi, le peptide 418-427 de l'antigène HSP65 de *Mycobacterium Leprae* peut être considéré comme une "molécule hétérologue d'intérêt", rendant l'objet des revendications 12-14 non nouveau.

- Les revendications 36 et 37 manquent de caractéristiques techniques définissant les anticorps concernés. La manière dont ils sont obtenus ne leur confère pas nécessairement des qualités particulières. Ainsi, leur nouveauté, en particulier vis-à-vis de ceux obtenus avec des peptides pris en charge par des molécules naturelles du CMH, est contestée. De ce fait, l'utilisation de l'anticorps anti-HLA-DR décrit dans D1 anticipe l'objet des revendications 36 et 37.

- Les coupes présentées à la Fig. 1 correspondent à des exosomes "immobilisés sur un support", comme indiqué à la revendication 45.

- Pour les raisons mentionnées ci-dessus, l'objet des revendications 1-2, 4, 7-8, 12-14, 32-34, 36-37, 39 et 43-45 n'est pas nouveau au vu de D1.

- D2 étudie les vésicules membranaires sécrétées par les mastocytes issus de la moelle épinière d'une souris. Elles sont riches en molécules du MHC de classe II (p 2633, Fig. 1) et leur sécrétion dans le milieu extracellulaire est induite par l'ajout d'IgE capable de se fixer sur les récepteurs présents à leur surface (p 2642, Fig. 7).

- Le complexe IgE-antigène utilisé dans D2 est considéré comme "une molécule hétérologue d'intérêt", liée aux vésicules membranaires du mastocyte par interaction avec le récepteur de haute affinité. De ce fait, l'objet des revendications 12-15, 32, 38 et 41 n'est pas nouveau.

- D3 rapporte que les cellules dendritiques, par exemple d'origine humaine, sécrètent des exosomes présentant à leur surface des récepteurs à la transferrine mais surtout des molécules du CMH à la fois des classes I et II (p 596, Fig. 2 et 3). Effectivement, un exosome portant le peptide (27-32) MART-1/MelanA est capable d'activer un clone HLA-A2 spécifique de lymphocytes T cytotoxiques et entraîne une stimulation de la production de IFN γ (p 595, colonne de gauche, l 22-30). Ce système offre des perspectives pour le traitement du cancer.

- Le terme "recombinant" utilisé dans la revendication 1 ne confère aucune propriété

RAPPORT D'EXAMEN

Demande internationale n° PCT/FR99/02691

PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPAREE

particulière aux molécules de CMH correspondantes (voir aussi Point VIII-1). Ainsi, les vésicules membranaires décrites dans D3 répondent aux critères des revendications 1 et 6-7. D3 anticipe donc le contenu des revendications 1, 6-7, 32, 38-39 et 43-44.

- Pour les raisons mentionnées ci-dessus, les revendications 1-2, 4, 6-8, 12-15, 32-34, 36-39, 41 et 43-45 ne remplissent pas les conditions de nouveauté énoncées à l'Article 33.2 PCT.

2) Activité inventive:

- Bien que nouveau, l'objet des revendications 3, 5, 9-11, 16-31, 35, 40, 42 et 46-47 ne semble pas pouvoir servir de base à la reconnaissance d'une activité inventive:

- Le problème technique que se propose de résoudre la présente demande est l'obtention de vésicules membranaires de composition contrôlée.

- La solution décrite dans la présente invention est l'utilisation de cellules productrices d'exosomes, en particulier des souches de mastocytes (A: revendications 18-19, 22 et 29) produisant peu de molécules de CMH (B: revendications 11 et 30), transformées par des ADN recombinants codant un produit d'intérêt (C: revendications 21 et 24) - à savoir des molécules du CMH (revendications 3, 5, 17, 20 et 26-28), une molécule de purification (revendication 9) ou un marqueur (revendication 10)- qui sera exprimé dans les exosomes, éventuellement à l'aide d'un signal d'adressage (D: revendications 16, 23, 25 et 31). De tels exosomes, éventuellement immobilisés sur des billes (E: revendication 47) pourront avoir diverses applications (F): obtenir des anticorps (revendication 35), détecter des complexes spécifiques du récepteur TcR (revendication 40) et des lymphocytes T spécifiques d'un complexe antigène-CMH (revendication 42), ou purifier des cellules (revendication 46).

- D1 anticipe l'essence-même de l'invention puisqu'il est proposé dans ce document d'introduire les gènes codant le CMH dans les cellules productrices d'exosomes, afin de contrôler davantage la présentation des antigènes à la surface des exosomes (p 6, l 25-32).

- La présente invention ne consiste donc qu'en une généralisation à toute molécule

d'intérêt (C) du principe déjà énoncé dans D1. Au vu de ce document, l'homme du métier aurait entrepris cette démarche avec des chances raisonnables de succès.

Les autres caractéristiques, présentes dans les revendications, semblent relever des connaissances et de la routine de l'homme du métier:

- L'utilisation avantageuse des mastocytes comme cellules productrices d'exosomes (A) est rapportée dans D2.
 - L'absence de molécules de CMH endogènes (B) aurait été un avantage évident à l'homme du métier.
 - La présence d'un signal d'adressage pour des protéines ancrées dans les membranes des exosomes étant connue, leur utilisation (D) pour assurer la localisation correcte d'une protéine d'intérêt aurait été une démarche de routine pour l'homme du métier.
 - L'immobilisation de vésicules (E) est considérée comme une mesure de routine.
 - Les applications envisagées (F) sont courantes dans ce domaine technique et déjà utilisées avec des vésicules présentant naturellement les propriétés requises.
- De ce fait, il est considéré que les revendications 1 à 47 ne remplissent pas les conditions énoncées à l'Article 33.3 PCT.

Concernant le point VII

Irrégularités dans la demande internationale

Contrairement à ce qu'exige la règle 5.1 a) ii) PCT, la description n'indique pas l'état de la technique antérieure pertinent exposé dans le document D1 et ne cite pas ce document.

Concernant le point VIII

Observations relatives à la demande internationale

1) Comme mentionné au Point V-1, l'origine ("recombinante", revendications 1-7, 9; "produite par une cellule modifiée génétiquement", revendication 1;) ou la source ("obtenue à partir d'une cellule de mastocyte ou dérivée de mastocyte modifiée

RAPPORT D'EXAMEN

Demande internationale n° PCT/FR99/02691

PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE

génétiquement", revendication 12) des vésicules revendiquées ne suffisent pas à les rendre nouvelles. Ainsi, il paraît difficile de pouvoir définir ces vésicules par des caractéristiques techniques (Article 6 PCT), les rendant nouvelles et inventives. En effet, même si elle sont obtenues par une méthode nouvelle et inventive, les vésicules en tant que telles auraient pu être trouvées dans un environnement naturel adapté ou auraient pu être obtenues synthétiquement, comme proposé dans D1.

(2) Les termes "dérivée" (revendications 12, 21 et 29; voir aussi Point V-1) et "essentiellement" (revendications 11 et 30) sont si vagues et si peu clairs qu'ils entraînent un doute quant à l'étendue de l'invention pour laquelle une protection est recherchée (Article 6 PCT).

3) L'expression "échantillon biologique" utilisée dans les revendications 36 et 39 à 42 n'exclut pas d'une manière explicite une utilisation *in vivo* qui serait, en l'absence de clarification (Article 6 PCT), visée par les dispositions de la Règle 67.1 (iv) PCT.

(4) Il est à noter qu'une caractéristique introduite par l'expression "de préférence" (revendications 5 et 19) ou "notamment" (revendications 19, 35 et 46-47) n'est pas prise en considération pour la définition de l'étendue de l'invention.

REVENDICATIONS

1. Vésicule membranaire produite par une cellule modifiée génétiquement, ladite vésicule comportant une molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité humain.

2. Vésicule selon la revendication 1 caractérisée en ce que la molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité est une molécule de classe II.

3. Vésicule selon la revendication 2 caractérisée en ce que la molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II est une chaîne α .

10 4. Vésicule selon la revendication 2 caractérisée en ce que la molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II comprend une chaîne α et une chaîne β .

5. Vésicule selon l'une des revendications 2 à 4 caractérisée en ce que la molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II est choisie parmi les
15 sérotypes DR1 à DR13, de préférence DR1 à DR7.

6. Vésicule selon la revendication 1 caractérisée en ce que la molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité est une molécule de classe I.

7. Vésicule selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisée en ce qu'elle comporte un complexe entre un peptide défini et la molécule recombinante du complexe majeur
20 d'histocompatibilité.

8. Vésicule selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre une ou plusieurs molécules hétérologues d'intérêt.

9. Vésicule selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre un peptide ou une protéine recombinant permettant sa purification.

25 10. Vésicule selon les revendications précédentes caractérisées en ce qu'elle comporte un marqueur.

11. Vésicule selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement dépourvue de molécules du CMH endogène.

12. Vésicule membranaire caractérisée en ce qu'elle est obtenue à partir d'une cellule
30 de mastocyte ou dérivée de mastocyte modifiée génétiquement, et en ce qu'elle comporte une ou plusieurs molécules hétérologues d'intérêt.

13. Vésicule selon la revendication 12, caractérisée en ce que la molécule d'intérêt est une protéine, un polypeptide, un peptide, un acide nucléique, un lipide ou une substance de nature chimique, biologique ou synthétique.

14. Vésicule membranaire selon la revendication 13, caractérisée en ce que la molécule hétérologue est une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité, un antigène, un ligand de récepteur, un récepteur de ligand, un acide nucléique, un produit pharmacologique, un marqueur et/ou un peptide de purification.

5 15. Vésicule selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'elle exprime un récepteur de ligand et en ce qu'elle comporte une autre molécule hétérologue d'intérêt.

16. Vésicule membranaire selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comporte une molécule recombinante de fusion entre un polypeptide d'intérêt et un signal d'adressage.

10 17. Cellule productrice d'exosomes, caractérisée en ce qu'elle comporte un ou plusieurs acides nucléiques recombinants codant pour une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité.

18. Cellule selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule de mastocyte.

15 19. Cellule selon la revendication 18, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une lignée mastocytaire d'une leucémie à basophile, notamment de la lignée RBL, de préférence RBL-2H3.

20 20. Cellule selon l'une des revendications 17 à 19, caractérisée en ce qu'elle comporte un acide nucléique recombinant codant pour une chaîne α et/ou une chaîne β d'une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II et/ou pour une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I.

21. Procédé de production d'une vésicule membranaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, comportant une molécule recombinante définie, comprenant les étapes suivantes:

25 a) la culture d'une cellule de mastocyte ou dérivée de mastocyte comportant un acide nucléique recombinant codant pour ladite molécule recombinante définie,

c) la récupération des vésicules produits par lesdites cellules, ces vésicules comprenant ladite molécule recombinante définie.

30 22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce qu'il comprend une étape intermédiaire b) au cours de laquelle les cellules sont stimulées pour induire et/ou augmenter la sécrétion des exosomes.

23. Procédé selon la revendication 21 ou 22 caractérisé en ce que la molécule recombinante définie est exposée à l'extérieur de l'exosome, ou est incluse, en partie ou en totalité, dans la fraction cytosolique de l'exosome.

24. Procédé selon l'une des revendications 21 à 23, caractérisé en ce que la molécule recombinante est une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité, une molécule antigénique, un ligand de récepteur, un récepteur de ligand, un peptide de purification ou tout autre polypeptide d'intérêt.

5 25. Procédé selon l'une des revendications 21 à 24 caractérisé en ce que l'acide nucléique comprend en outre une région codant pour un signal d'adressage vers les compartiments membranaires du mastocyte.

26. Procédé de préparation d'un exosome comportant un complexe peptide-CMH de composition définie, caractérisé en ce qu'il comprend:

- 10 - la culture d'une cellule productrice d'exosomes comprenant un ou plusieurs acides nucléiques recombinants codant pour une molécule recombinante définie du CMH,
 - la stimulation des cellules pour induire une libération des exosomes,
 - la récupération des exosomes produits par lesdites cellules, ces exosomes exprimant à leur surface ladite molécule recombinante définie du CMH, et,
 15 - la mise en contact des exosomes avec le ou les peptides.

27. Procédé de préparation d'un exosome comportant un complexe peptide-CMH de composition définie, caractérisé en ce qu'il comprend:

- la culture d'une cellule productrice d'exosomes comportant un ou plusieurs acides nucléiques recombinants codant pour une molécule recombinante définie du CMH et un
 20 acide nucléique comprenant une région codant pour un peptide recombinant défini,
 - la stimulation des cellules pour induire une libération des exosomes,
 - la récupération des exosomes produits par lesdites cellules, ces exosomes exprimant à leur surface ladite molécule recombinante définie du CMH associée audit peptide recombinant.

25 28. Procédé selon la revendication 27, caractérisé en ce que l'acide nucléique codant pour le peptide recombinant code pour un dérivé de la chaîne invariante li, dans lequel la région CLIP a été déléetée et substituée par ledit peptide.

29. Procédé selon l'une des revendications 26 à 28 caractérisé en ce que la cellule productrice est une cellule de mastocyte ou dérivée de mastocyte.

30 30. Procédé selon l'une des revendications 26 à 29 caractérisé en ce que la cellule productrice est essentiellement dépourvue de molécule du CMH endogène.

31. Procédé de modification de la composition d'un exosome, comprenant

- l'introduction dans une cellule productrice d'exosomes d'un acide nucléique codant pour une molécule définie, liée à un signal d'adressage dans les compartiments
 35 membranaires, et,

- la production d'exosomes à partir de ladite cellule.

32. Composition comprenant une ou plusieurs vésicules membranaires selon l'une des revendications 1 à 16.

33. Utilisation d'une vésicule selon l'une des revendications 1 à 16 pour la production d'anticorps, polyclonaux et/ou monoclonaux.

34. Procédé de production d'anticorps, comprenant l'immunisation d'un animal avec une vésicule selon la revendication 7 et la récupération des anticorps et/ou des cellules produisant des anticorps ou impliquées dans la réponse immunitaire.

35. Procédé selon la revendication 34, pour la production d'anticorps monoclonaux, notamment spécifiques de l'association CMH-peptide.

36. Utilisation d'un anticorps obtenu selon la revendication 34 ou 35, ou d'un fragment d'un tel anticorps, pour la détection, dans un échantillon biologique, de la présence d'antigènes spécifiques correspondants.

37. Utilisation d'un anticorps produit selon la revendication 34 ou 35, d'un fragment d'un tel anticorps, ou d'une vésicule selon la revendication 1 pour la préparation d'une composition thérapeutique destinée à inhiber l'interaction entre le récepteur d'un lymphocytes T et le complexe CMH-peptide pour lequel il est spécifique.

38. Utilisation d'une vésicule membranaire selon l'une des revendications 1 à 16 pour la détection *in vitro* ou *ex vivo* de partenaires spécifiques d'une molécule protéique dans un échantillon biologique.

39. Utilisation selon la revendication 38 d'un exosome portant un complexe CMH-peptide pour la détection de lymphocytes T spécifiques de ce complexe dans un échantillon biologique.

40. Utilisation selon la revendication 38 d'un exosome portant un récepteur TcR pour la détection de complexes peptide-CMH spécifiques de ce récepteur dans un échantillon biologique.

41. Utilisation selon la revendication 38 d'un exosome portant un récepteur de ligand pour la détection de la présence dudit ligand dans un échantillon biologique.

42. Méthode pour la détection *in vitro* ou *ex vivo* de la présence de lymphocytes T spécifiques de complexes antigène-CMH dans un échantillon biologique, comprenant la mise en contact dudit échantillon avec un exosome marqué selon la revendication 7, comportant ledit complexe antigène-CMH, et la mise en évidence du marquage de lymphocytes T dans ledit échantillon.

43. Utilisation d'une vésicule selon la revendication 7 pour l'amplification clonale et/ou la stimulation *ex vivo* de lymphocytes T cytotoxiques ou auxiliaires.

44. Utilisation d'une vésicule selon l'une des revendications 12 à 16 pour la préparation d'une composition destinée à véhiculer ladite molécule vers une cellule.

45. Composition comprenant une ou plusieurs vésicules membranaires immobilisées sur un support.

5 46. Utilisation d'une vésicule membranaire selon l'une des revendications 1 à 16, notamment sous forme immobilisée sur un support, pour la purification de cellules.

47. Composition selon la revendication 45, comprenant une ou plusieurs vésicules membranaires immobilisées sur une bille, notamment une bille en latex ou une bille magnétique.

10

CLAIMS

1. Membrane vesicle, characterised in that it comprises a recombinant molecule of the human major Histocompatibility complex.

2. Vesicle according to claim 1, characterised
5 in that the recombinant molecule of the major Histocompatibility complex is a class II molecule.

3. Vesicle according to claim 2, characterised in that the recombinant class II molecule of the major Histocompatibility complex is an α chain.

10 4. Vesicle according to claim 2, characterised in that the recombinant class II molecule of the major Histocompatibility complex comprises an α chain and a β chain.

5. Vesicle according to any of claims 2 to 4,
15 characterised in that the recombinant class II molecule of the major Histocompatibility complex is chosen from among the serotypes DR1 to DR13, preferably from DR1 to DR7.

6. Vesicle according to claim 1, characterised
20 in that the recombinant molecule of the major Histocompatibility complex is a class I molecule.

7. Vesicle according to any of claims 1 to 6, characterised in that it contains a complex between a defined peptide and the recombinant molecule of the
25 major Histocompatibility complex.

REPLACED BY
ART 34 AMDT

8. Vesicle according to any of the preceding claims, characterised in that it also contains one or more heterologous molecules of interest.

5 9. Vesicle according to any of the preceding claims, characterised in that it also contains a peptide or a recombinant protein enabling its purification.

10. Vesicle according to the preceding claims, characterised in that it comprises a tracer.

10 11. Vesicle according to any of the preceding claims, characterised in that it is essentially free of molecules of the endogenous MHC.

12. Membrane vesicle characterised in that it is obtained from a mastocyte or mastocyte derived cell,
15 and in that it contains one or more heterologous molecules of interest.

13. Vesicle according to claim 12, characterised in that the molecule of interest is a protein, a polypeptide, a peptide, a nucleic acid, a
20 lipid or a substance of chemical, biological or synthetic nature.

14. Membrane vesicle according to claim 13, characterised in that the heterologous molecule is a molecule of the major Histocompatibility complex, an
25 antigen, a receptor ligand, a ligand receptor, a nucleic acid, a pharmacological product, a tracer and/or a purification peptide.

REPLACED BY
ART 34 AMDT

15. Vesicle according to claim 14, characterised in that it expresses a ligand receptor, and in that it contains another heterologous molecule of interest.

5 16. Membrane vesicle, characterised in that it contains a recombinant fusion molecule between a polypeptide of interest and an addressing signal.

10 17. Exosome-producing cell, characterised in that it contains one or more recombinant nucleic acids coding for a molecule of the major Histocompatibility complex.

18. Cell according to claim 17, characterised in that it is a mastocyte cell.

15 19. Cell according to claim 18, characterised in that it is mastocyte line of a basophilic leukemia, in particular of the RBL line, preferably RBL-2H3.

20 20. Cell according to claims 17 to 19, characterised in that it comprises a recombinant nucleic acid coding for an α chain and/or a β chain of a class II molecule of the major Histocompatibility complex and/or for a class I molecule of the major Histocompatibility complex.

25 21. Method for producing an exosome containing a defined recombinant molecule, comprising the following steps :

a) culture of a mastocyte or mastocyte-derived cell containing a recombinant nucleic acid coding for said defined recombinant molecule,

REPLACED BY
ART 34 AMDE

c) recovery of the exosomes produced by said cells, these exosomes containing said defined recombinant molecule.

22. Method according to claim 21, characterised
5 in that it comprises an intermediate step b) during which the cells are stimulated to induce and/or increase the secretion of exosomes.

23. Method according to claim 21 or 22,
characterised in that the defined recombinant molecule
10 is exposed outside the exosome, or is included, wholly or in part, in the cytosolic fraction of the exosome.

24. Method according to any of claims 21 to 23,
characterised in that the recombinant molecule is a
molecule of the major Histocompatibility complex, an
15 antigenic molecule, a receptor ligand, a ligand receptor, a purification peptide or any other polypeptide of interest.

25. Method according to any of claims 21 to 24,
characterised in that the nucleic acid also comprises a
20 region coding for an addressing signal towards the membrane compartments of the mastocyte.

26. Method for preparing an exosome containing
a peptide-MHC complex of defined composition,
characterised in that it comprises :

25 - culture of an exosome-producing cell containing one or more recombinant nucleic acids coding for a defined recombinant molecule of the MHC,

REPLACED BY
ART 34 AMBT

- stimulation of the cells to induce release of the exosomes,

- recovery of the exosomes produced by said cells, these exosomes expressing on their surface said defined recombinant molecule of the MHC, and

- placing the exosomes in contact with the peptide or peptides.

27. Method for preparing an exosome containing a peptide-MHC complex of defined composition, characterised in that it comprises :

- culture of an exosome-producing cell containing one or more recombinant nucleic acids coding for a defined recombinant molecule of the MHC and a nucleic acid containing a region coding for a defined recombinant peptide,

- stimulation of the cells to induce release of the exosomes

- recovery of the exosomes produced by said cells, these exosomes expressing on their surface said defined recombinant molecule of the MHC associated with said recombinant peptide.

28. Method according to claim 27, characterised in that the nucleic acid coding for the recombinant peptide codes for a derivative of the Ii invariant chain, in which the CLIP region has been deleted and substituted by said peptide.

REPLACED BY
ART 34 AMDT

29. Method according to any of claims 26 to 28, characterised in that the producer cell is a mastocyte or mastocyte-derived cell.

30. Method according to any of claims 26 to 29,
5 characterised in that the producer cell is essentially free of molecules of the endogenous MHC.

31. Method for modifying the composition of an exosome, comprising :

- insertion into an exosome-producing cell of
10 a nucleic acid coding for a defined molecule, bound to an addressing signal in the membrane compartments, and
- production of exosomes from said cell.

32. Composition containing one or more membrane vesicles according to any of claims 1 to 16.

15 33. Use of a vesicle according to any of claims 1 to 16 for the production of polyclonal and/or monoclonal antibodies.

34. Method for producing antibodies, comprising immunisation of an animal with a vesicle according to
20 claim 7 and recovery of the antibodies and/or cells producing antibodies or involved in the immunity response.

35. Method according to claim 34 for the production of monoclonal antibodies, in particular
25 specific for the MHC-peptide association.

36. Use of an antibody obtained according to claim 34 or 35, or of a fragment of said antibody, for

REPLACED BY
ART 34 AMDT

the detection, in a biological sample, of the presence of corresponding specific antigens.

37. Use of an antibody produced according to claim 34 or 35, of a fragment of said antibody, or of a vesicle according to claim 1 for the preparation of a therapeutic composition intended to inhibit the interaction between the receptor of a T-lymphocyte and the MHC-peptide complex for which it is specific.

38. Use of a membrane vesicle according to any of claims 1 to 16 for the detection of partners specific for a protein molecule in a biological sample.

39. Use according to claim 38 of an exosome carrying a MHC-peptide complex for the detection of T-lymphocytes specific to this complex in a biological sample.

40. Use according to claim 38 of an exosome carrying a TcR receptor for the detection of peptide-MHC complexes specific to this receptor in a biological sample.

41. Use according to claim 38 of an exosome carrying a ligand receptor for the detection of the presence of said ligand in a biological sample.

42. Method for the detection of the presence of T-lymphocytes specific to antigen-MHC complexes in a biological sample, comprising placing said sample in contact with an exosome labelled according to claim 7, containing said antigen-MHC complex, and evidencing the labelling of T-lymphocytes in said sample.

REPLACED BY
ART 3.1.1.1

43. Use of a vesicle according to claim 7 for the clonal amplification and/or *ex vivo* stimulation of cytotoxic and/or auxiliary T-lymphocytes.

44. Use of a vesicle according to any of claims 5 11 to 16 for the preparation of a composition intended to vehicle said molecule towards a cell.

45. Composition containing one or more exosomes immobilised on a support.

46. Use of a membrane vesicle according to any 10 of claims 1 to 16, in particular in immobilised form on a support, for the purification of cells.

REPLACED BY
ART 31 AMDT

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire B0018W0	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° PCT/FR 99/ 02691	Date du dépôt international(jour/mois/année) 04/11/1999	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 05/11/1998
Déposant INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RE..et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la langue, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
- ☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

- b. En ce qui concerne les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).
3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le titre,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- ☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'abrégé,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- ☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°

- ☐ suggérée par le déposant.
- ☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- ☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒ Aucune des figures n'est à publier.

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N5/10 A61K39/385 C07K16/00 C12N15/12 G01N33/50
A61K39/395

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 97 05900 A (RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN ET AL.) 20 février 1997 (1997-02-20) page 6, ligne 13 - ligne 32; revendications	1-7, 17, 20
A	G. RAPOSO ET AL.: "ACCUMULATION OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS II MOLECULES IN MAST CELL SECRETORY GRANULES AND THEIR RELEASE UPON DEGRANULATION." MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, vol. 8, no. 12, décembre 1997 (1997-12), pages 2631-2645, XP002113183 BETHESDA, MD, US cité dans la demande page 2643, colonne de gauche, alinéa 2 -colonne de droite, alinéa 1 -/-	1-46

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 avril 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

27/04/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Rykebosch, A

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>G. RAPOSO ET AL.: "B LYMPHOCYTES SECRETE ANTIGEN-PRESENTING VESICLES." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 183, mars 1996 (1996-03), pages 1161-1172, XP002060486 NEW YORK, N.Y., US cité dans la demande page 1170, colonne de droite, alinéa 2</p>	1-46
A	<p>L. ZITVOGEL ET AL.: "ERADICATION OF ESTABLISHED MURINE TUMORS USING A NOVEL CELL-FREE VACCINE: DENDRITIC CELL-DERIVED EXOSOMES." NATURE MEDICINE, vol. 4, no. 5, mai 1998 (1998-05), pages 594-600, XP002085387 new york, n.y., us cité dans la demande page 594, colonne de droite, alinéa 1</p>	1-46

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9705900 A	20-02-1997	AU 6632496 A	05-03-1997
		CA 2225553 A	20-02-1997
		EP 0841945 A	20-05-1998
		JP 11510507 T	14-09-1999

This Page Blank (uspto)